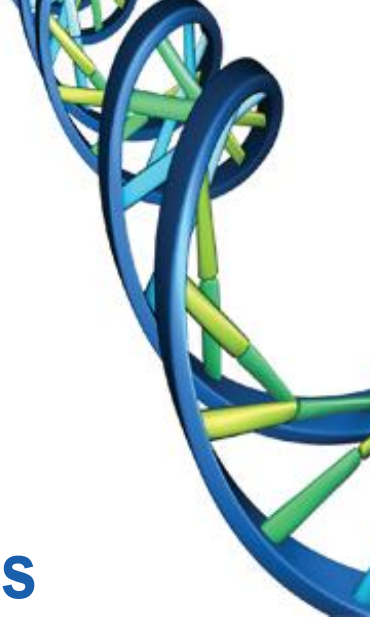


Bedienungsanleitung für das SURVEYOR® Scan *KRAS* Kit Exon 2 CE IVD

für DHPLC Systeme

CE IVD

Bitte lesen Sie diese Bedienungsanleitung sorgfältig durch, bevor Sie dieses Produkt verwenden.

Bewahren sie diese Bedienungsanleitung auf, vielleicht möchten Sie später etwas nachschlagen.

Transgenomic®
Advancing Personalized Medicine

Diese Seite ist absichtlich leer

Inhaltsverzeichnis

1 Hersteller 3
2 SURVEYOR Scan *KRAS* Kit Exon 2 CE IVD 3
2.1 Verwendungszweck 3
2.2 Angaben zum Gebrauch 3
3 Testprinzip des SURVEYOR Scan *KRAS* Mutation Detection Assay 4
3.1 *KRAS* und *NRAS* 4
3.2 Analyse von Patientenproben mit den SURVEYOR Scan Kits 4
3.3 SURVEYOR Nuclease 5
4 Rückverfolgbarkeit der Kit-Kontrollen 6
5 Komponenten 6
5.1 Anzahl der Proben, die mit dem Kit getestet werden können 6
5.2 DNA-Sequenzierung 7
6 Zusätzlich erforderliche Ausrüstung und Reagenzien 7
7 Reagenzienvorbereitung 8
8 Lagerung und Haltbarkeit 8
9 Warnhinweise & Vorsichtsmaßnahmen 8
10 Primäre Probenentnahme, Handhabung und Lagerung 8
11 Testverfahren 9
11.1 Somatischer Mutationsnachweis mit SURVEYOR Scan Kits – Ein Überblick 9
12 Schritt-für-Schritt-Anleitung 10
12.1 DHPLC Grundeinstellung/Kalibration 10
12.2 Überlegungen vor Beginn der *KRAS*-Probenanalyse 10
12.3 Überlegungen zu den Matrizen 10
12.4 Überlegungen zum Arbeitsablauf 11
12.5 Amplifikationsprotokoll 13
12.7 Thermocycler-Programm für Amplifikationsprotokoll 15
12.8 Qualitätskontrolle der PCR-Produkte 15
12.9 SURVEYOR Nuclease Verdau 16
13 Kontrollverfahren 17
13.1 Qualitätskontrolle für das SURVEYOR Scan *KRAS* Kit Exon 2 CE IVD 17
13.2 Verwendung von Kontrollplasmid-DNAs 18
14 Interpretation der Ergebnisse 18
14.1 Analyse des *KRAS* Exon 2 mit der SURVEYOR Nuclease 18
14.2 Auswertung der SURVEYOR Scan-Ergebnisse 19
14.3 Beispielergebnisse 20
15 Leistungsmerkmale 21
15.1 Nachweisgrenze von Mutationen mit SURVEYOR Scan-Kits 21
15.2. Sequenzbestätigung 21
15.3 Verfahrensbeschränkungen 21
Anhang A 23
A.1 Plattenlayout für SURVEYOR Scan Kits 23
A.2 Kontroll-DNA-Stempel 23
A.3 HPLC (DHPLC) Systemanforderungen für die Denaturierung 23
A.4 Laborbedingungen für PCR-Tests 24
A.5 Literaturnachweis 26
Anhang B 27
Fehlersuche 27
Einzelheiten zur Bestellung 33
Kontaktdaten 33
Übersetzung Verzicht 33
Lizenzen, Handelsmarken & Copyright 34

1 Hersteller

Hersteller		Transgenomic, Inc. 12325 Emmet Street, Omaha, NE 68164, USA. Tel. +1-402-452-5400.
Vertreter in der EU		Transgenomic Limited, 40 Watt Road, Hillington Park, Glasgow G52 4RY, UK. Tel. +44-141-892-8800.

2 SURVEYOR Scan *KRAS* Kit Exon 2 CE IVD

2.1 Verwendungszweck

Anwendung nur durch Fachpersonal. Transgenomics SURVEYOR Scan *KRAS* Kit Exon 2 CE IVD ist ein In-vitro-Diagnostikum, das die somatischen Mutationen in Exon 2 of des *KRAS*-Gens nachweist. Diese Mutationen werden durch SURVEYOR Nuclease Spaltprodukte angezeigt und enthalten Mutationen die bekannte Auswirkungen auf klinische Anwendungen haben.

Dieses Kit ist für den Gebrauch in einem Labor für klinische Diagnostik durch entsprechend ausgebildetes Fachpersonal vorgesehen. Getestet wird DNA, die aus formalinfixiertem und in Paraffin eingebettetem Gewebe extrahiert wird.

Dieses Kit, Katalognummer 710104, wird in einem Karton geliefert, der die nachstehend aufgeführten Komponenten enthält. Diese Bedienungsanleitung ist auch als Download erhältlich unter http://world.transgenomic.com/files/literature/482404-DE.pdf.

2.2 Angaben zum Gebrauch

Mediziner können den SURVEYOR Scan *KRAS* Kit Exon 2 CE IVD mit den DHPLC-Systemen als Hilfe bei der Entscheidung verwenden, ob Patienten mit kolorektalem Karzinom auf eine Therapie mit einem Anti-EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor bzw. epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor)-Therapeutikum wie Panitumumab ansprechen.

Das SURVEYOR Scan *KRAS* Kit Exon 2 CE IVD muss zusammen mit dem SURVEYOR Scan *KRAS* Kit Exons 3 & 4 CE IVD und dem SURVEYOR Scan *NRAS* Kit Exons 2, 3 & 4 CE IVD verwendet werden.

Das SURVEYOR Scan *KRAS* Kit Exon 2 CE IVD **darf nicht** zur Diagnose von kolorektalem Karzinom oder anderer Krebsarten verwendet werden.

Das SURVEYOR Scan *KRAS* Kit Exon 2 CE IVD weist auf die Anwesenheit von potenziellen somatischen Mutationen im *KRAS*-Gen Exon 2 hin, bestätigt aber nicht die Sequenzidentität der Mutation. **Um nachzuweisen, um welche Mutation es sich genau handelt, sind weitere Untersuchungen wie zum Beispiel eine DNA-Sequenzierung erforderlich.**

Die mit diesem Kit erhaltenen Ergebnisse sollten ein Hinweis auf den Mutationsstatus eines Patienten sein, es müssen jedoch weitere klinische Faktoren berücksichtigt werden, einschließlich Mutationen in *KRAS* Exons 3 & 4 und *NRAS* Exons 2, 3 & 4. Ergebnisse mit dem SURVEYOR Scan *KRAS* Kit Exon 2 CE IVD **dürfen nicht als die einzige Methode zur Entscheidungsfindung einer Behandlung von Patienten mit kolorektalem Karzinom herangezogen werden**.

Es ist wichtig, darauf hinzuweisen, dass Die Anwendung der DHPLC-Methode mit diesem Kit zur Identifikation von Proben mit positivem Testergebnis für eine *KRAS*-Mutation nur als Richtlinie zu verwenden ist und **alle Mutationen durch weitere Analyse, wie zum Beispiel durch eine DNA-Sequenzierung, bestätigt werden müssen.**

3 Testprinzip des SURVEYOR Scan *KRAS* Mutation Detection Assay

3.1 *KRAS* und *NRAS*

Auf den Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) gerichtete therapeutische Wirkstoffe haben sich bei kolorektalem Karzinom als wirksam erwiesen. Die Forschung hat gezeigt, dass rund 40% der kolorektalen Tumoren somatische *KRAS*-Genmutationen tragen, und klinische Studien haben bewiesen, dass Mutationen in *KRAS* Exon 2 (Codon 12 und 13) mangelndes klinisches Ansprechen auf Anti-EGFR-Therapien voraussagen. Neueste explorative Studien haben gezeigt, dass Patientenpopulationen weiter differenziert werden können, da Patienten, deren mCRC-Tumoren eine zusätzliche Mutation in *KRAS* Exon 3 und 4 oder *NRAS* Exon 2, 3 und 4 bergen, ebenfalls dazu neigen, nicht auf eine Therapie mit Anti-EGFR anzusprechen[1-7]. Dieses Kit wurde für den Gebrauch in der diagnostischen Analyse von somatischen *KRAS* Exon 2-Mutationen entwickelt.

Das SURVEYOR Scan *KRAS* Kit Exon 2 CE IVD ist ein Test für den Nachweis aller Sequenzen und kleiner Insertions-/Deletionsmutationen in Exon 2 des *KRAS*-Gens. Mutationen im *KRAS* Codon 12 und 13 wurden mit der mangelnder Wirksamkeit von Panitumumab in Verbindung gebracht. Mit diesem Kit werden Positive Control für Mutationen in Codon 12 mitgeliefert.

Dieses Kit verwendet die patentrechtlich geschützte Technologie SURVEYOR Nuclease von Transgenomic und bietet in Verbindung mit der DHPLC-Technologie einen einfachen und empfindlichen Mutationsnachweis. Damit kann vor einem Hintergrund aus nicht-mutanter DNA ein Gemisch aus 2–5% mutanter DNA nachgewiesen werden. Untersuchungen zur Validierung haben eine sehr hohe Übereinstimmung mit der Sequenzierung von gut charakterisierten kolorektalen Tumorproben gezeigt. Durch die Verwendung des SURVEYOR Scan *KRAS* Kit Exon 2 CE IVD reduziert sich für den Anwender die Sequenzierungsarbeit und ermöglicht darüber hinaus eine sehr genaue Sequenzzuordnung, wo eine automatische Sequenzierungssoftware eine Mutation oft nicht klären kann.

Aufgrund der hohen Empfindlichkeit verglichen mit der Sanger-Sequenzierung wird empfohlen, die Laboreinrichtung zu optimieren, um eine Kreuzkontamination von Proben oder Kontrollen zu vermeiden. Ein Beispiel einer idealen Laboreinrichtung finden Sie im ***Anhang A.4 Laboreinrichtung für PCR-Tests***.

3.2 Analyse von Patientenproben mit den SURVEYOR Scan Kits

Das SURVEYOR Scan *KRAS* Kit Exon 2 CE IVD darf nur zusammen mit einem der unten genannten Arbeitsabläufen verwendet werden.

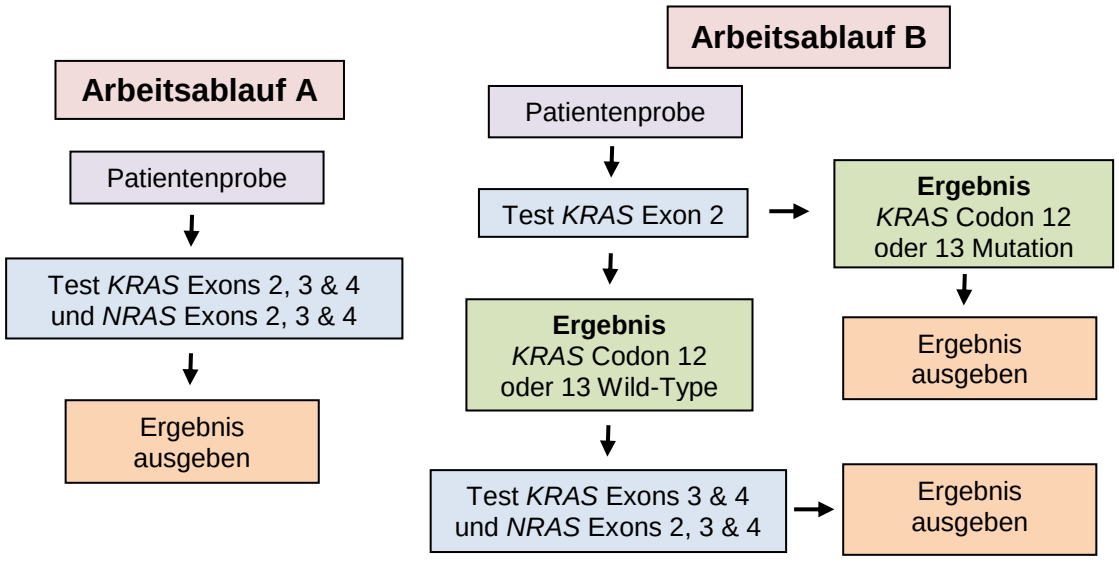

Arbeitsablauf A
Patientenprobe
Test *KRAS* Exons 2, 3 & 4 und *NRAS* Exons 2, 3 & 4
Ergebnis ausgeben
Arbeitsablauf B
Patientenprobe
Test *KRAS* Exon 2
Ergebnis *KRAS* Codon 12 oder 13 Mutation
Ergebnis ausgeben
Ergebnis *KRAS* Codon 12 oder 13 Wild-Type
Test *KRAS* Exons 3 & 4 und *NRAS* Exons 2, 3 & 4
Ergebnis ausgeben

Abbildung 1 SURVEYOR Scan Mutation Detection Kit Arbeitsabläufe für das Screening auf *KRAS* und *NRAS*

Als Vorschlag, wie eine 96-Loch-Mikrotiterplatte für die Analyse von *KRAS* Exon 2-4 und *NRAS* Exon 2–4 anzulegen ist, siehe ***Anhang A.1 Plattenlayout für SURVEYOR Scan Kits***.

3.3 SURVEYOR Nuclease

Die SURVEYOR Nuclease von Transgenomic ist eine mismatch-spezifische Pflanzen-DNA-Endonuclease, die die Heteroduplex-DNA auf bekannte und unbekannte Mutationen und Polymorphismen durchsuchen kann[8]. Das Enzym schneidet mit hoher Spezifität einen DNA-Doppelstrang an Stellen, wo durch einen Basenaustausch oder andere Sequenzveränderungen Basen nicht miteinander paaren können. Diese DNA-Nuclease spaltet beide Stränge eines DNA-Heteroduplex am 3'-Ende der Mismatch-Stelle. Insertion-/Deletion-Mismatches und alle Basenaustausch-Mischmatches werden erkannt, aber die Spalteffizienz variiert mit der Mismatch-Sequenz.

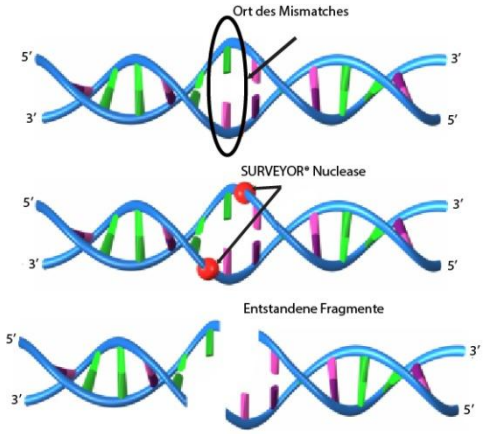


Abbildung 2: Wirkungsweise der SURVEYOR Nuclease Die Endonuclease erkennt ein Mismatch und spaltet am 3'-Ende der Mismatch-Basen. Das spaltet den DNA-Doppelstrang, was einen einzigen 3'-Basenüberhang hinterlässt.

Die SURVEYOR Nuclease wurde in einer ganzen Reihe von Projekten eingesetzt, um in Genen eine Vielzahl von Mutationen und Polymorphismen nachzuweisen. Insbesondere wird die SURVEYOR Nuclease verwendet, um in einer Reihe von Genen bekannte Mutationen zu bestätigen, die mit Nieren-, Lungen-, Kopf- und Halskrebs sowie Leukämie und Endometriumkarzinom in Verbindung gebracht werden. Ebenso wurde sie zur Ergebnisprognose einer Strahlentherapie eingesetzt[9,10,11].

Das SURVEYOR Scan *KRAS* Kit Exon 2 CE IVD ist zur Spaltung von Mismatches im *KRAS* Exon 2 und der anschließenden Analyse durch die DHPLC-Technologie vorgesehen.

Anmerkung: Wenn eine Probe 100% mutante DNA enthält**, können keine Heteroduplices gebildet werden und die Probe erscheint als "Wild-Type". Allerdings enthalten aufgrund von Tumorheterogenität und/oder kontaminierendem normalen Gewebe Biopsieproben von Tumoren Wild-Type-Zellen; bitte beachten Sie, dass mit diesem Kit das Ergebnis für 5% Wild-Type identisch zu Ergebnissen mit 5% mutanter DNA sind.**

Anmerkung: Für diesen Test ausschließlich die mit diesem Kit mitgelieferte DNA-Polymerase verwenden.

Anmerkung: Befolgen Sie bitte die spezifischen Anleitungen im Bedienungshandbuch Ihres DHPLC-Systems.

Um dieses Kit erfolgreich einzusetzen, wird dringend angeraten, diese Bedienungsanleitung sorgfältig durchzulesen und alle darin gegebenen Anleitungen und Richtlinien genau zu befolgen. Personen, die diesen Test zum ersten Mal durchführen, sollten die in Abschnitt *Verwendung der Kontrollplasmid-DNAs* beschriebenen Kontrolluntersuchungen durchführen.

Falls Sie weitere Fragen haben oder Hilfe benötigen, rufen Sie (888) 233-9283 (nur Nordamerika), **+1 (402) 452-5400** oder **+44 (0) 141 892 8800** (Europa) an und fragen nach dem „*KRAS* Support". Alternativ können Sie eine E-Mail senden an:

SURVEYORscan@Transgenomic.com

4 Rückverfolgbarkeit der Kit-Kontrollen

Die mit diesem Kit mitgelieferten Kontrollen sind Plasmidklone der *KRAS* Exon 2-Sequenzen. Alle Klone wurden sequenziert, um sie durch Vergleich mit der NCBI Reference Sequence auf Sequenztreue zu überprüfen: NG_007524.1.

Die Kontrollen haben einen genetischen "Stempel". Siehe ***Anhang A.2 Kontroll-DNA-Stempel***; diese Variationen von der *KRAS*-Wild-Type-Sequenz, wo keine Mutationen erwartet werden, können verwendet werden, um Probleme mit Probenkontamination durch Positive Controls zu erkennen. Siehe ***Anhang B - Fehlersuche***, ***Problem 8***, für ein Beispiel eines SURVEYOR Scan Ergebnisses einer solchen Kontamination.

Der **"*KRAS* Control Wild-Type**" wurde durch Synthese und Klonierung von *KRAS* Exon 2 unter Verwendung der NCBI Referenzsequenz oben konstruiert.

Das "***KRAS* Positive Control Exon 2**" wurde durch Synthese von *KRAS* Exons 2, 3 und 4 unter Verwendung der NCBI Reference Sequence oben konstruiert, enthält aber die G12D-Mutation. DNA-Sequenzierung bestätigte, dass die einzige Änderung in der Sequenz von Codon 12 in einer G12D-Alteration (GGT>AGT) vorliegt. Dieser Klon wird dann mit *KRAS* Control Wild-Type-DNA gemischt, um eine heterozygote Mischung zu erhalten.

5 Komponenten

Das SURVEYOR Scan *KRAS* Kit Exon 2 CE IVD besteht aus (1) einer **SURVEYOR Box mit Verdau-Komponenten** mit 10 Reagenzgefäßen ohne leere Löcher und (2) einer Schachtel für **PCR-Komponenten und Kontrollröhrchen** mit 11 Reagenzgefäßen und 9 leeren Löchern.

Katalog-nummer	Kit-Komponente	Reaktionsgefäß Deckelfarbe	Kit für 100 Testreaktionen gelieferte Menge
SURVEYOR Box mit Verdau-Komponenten			
710160	SURVEYOR Nuclease W	Violett	2 x 105 µL
710161	SURVEYOR Enhancer W2	Schwarz	105 µL
708049	SURVEYOR Enhancer Cofactor	Rosa	105 µL
708027	0.15 M $MgCl_2$ Solution	Braun	105 µL
708030	SURVEYOR Stop Solution	Rot	250 µL
710153F	Universal Sequencing Primer 1 (10 µM)	Orange	2 x 125 µL
710153R	Universal Sequencing Primer 2 (10 µM)	Orange	2 x 125 µL
PCR-Box mit Komponenten und Kontrollen			
703310	DNA Polymerase	Rot	100 µL
703315	DNA Polymerase 10X PCR Buffer	Durchsichtig	1 mL
703065	dNTPs (10 mM)	Durchsichtig	500 µL
710155F	*KRAS* Primer Exon 2 Forward (10 µM)	Blau	3 x 90 µL
710155R	*KRAS* Primer Exon 2 Reverse (10 µM)	Blau	3 x 90 µL
710131	*KRAS* Control Wild-Type	Gelb	120 µL
710135	*KRAS* Positive Control Exon 2	Grün	40 µL
482404	Bedienungsanleitung	Download von der Webseite* http://world.transgenomic.com/files/literature/482404-DE.pdf	

5.1 Anzahl der Proben, die mit dem Kit getestet werden können

Mit dem SURVEYOR Scan *KRAS* Kit Exon 2 CE IVD können 100 Reaktionen durchgeführt werden. Die Gesamtprobenanzahl hängt von der Größe der jeweiligen durchschnittlichen Seriengrößen zu testender Proben ab, da mit jeder Probenserie jeweils ein Satz Kontrollreaktionen (Wild-Type Control, Positive Control und No Template Control) auf jeder Mikrotiterplatte mitgeführt werden muss. In der nachstehenden Tabelle ist die Anzahl Proben aufgeführt, die mit dem *KRAS*-Kit je nach durchschnittlicher Größe der Probenserie getestet

werden können. Die Berechnung beruht auf der Basis, dass (a) für jeden Lauf 3 Kontrollen (1x Wild-Type, 1x Positive Control, 1x No Template Control) benötigt, und (b) jedes Kit für 100 Reaktionen ausgelegt ist.

Anmerkung: Wenn mehrere Mikrotiterplatten laufen sollen, muss auf jeder einzelnen Mikrotiterplatten ein Satz der oben angegebenen Kontrollen mitgeführt werden. Daher benötigen zwei Mikrotiterplatten insgesamt 6 Kontrollreaktionen, 3 Mikrotiterplatten benötigen 9 Kontrollreaktionen, usw.

Mit Ansteigen der Größe der Probenserie erhöht sich auch die Anzahl der Proben, die insgesamt mit einem Kit getestet werden können, wodurch sich die Reagenzienkosten je Probe im Durchschnitt reduzieren. Die Tabelle unten dient als Orientierung dafür, wie viel Proben mit einem einzigen Kit getestet werden können.

Größe der Proben-serie	Anz. Kontrollreaktionen + Anz. Proben-Amplikons	Anz. erforderl. Reaktionen pro Lauf	Gesamt-anz. Proben-serienläufe pro Kit	Gesamtanz. getesteter Proben pro Kit
1	3 + 1	4	25	25
2	3 + 2	5	20	40
3	3 + 3	6	16	48
4	3 + 4	7	14	56
5	3 + 5	8	12	60

5.2 DNA-Sequenzierung

Universal Sequencing Primers (PNs 710153F und 710153R) werden für die DNA-Sequenzierung aller getesteten Proben mitgeliefert. Die vor dem SURVEYOR Nuclease-Verdau erzeugten PCR-Amplikons sollten für die Sequenzierung verwendet werden.

6 Zusätzlich erforderliche Ausrüstung und Reagenzien

Folgende Komponenten bzw. Ausrüstungen sind für die Verwendung des SURVEYOR Scan *KRAS* Kit Exon 2 CE IVD mit dem DHPLC zusätzlich erforderlich:

DHPLC-System, Säulen, Puffer, DNA-Größenstandard
- siehe ***Anhang A.3.1 DHPLC Spezifikationen für SURVEYOR Scan Anwendungen*** für Merkmale eines geeigneten DHPLC-System zur Verwendung mit diesem Kit

Hochreines Wasser für die Molekularbiologie

0,2-mL-PCR-Reaktionsgefäße, Streifen oder 96-Loch-Mikrotiterplatte

Mikropipetten

Pipettenspitzen

Eisbad

Vortexer

Mikrozentrifuge

Thermocycler

Agarosegele und Ausrüstung für Agarosegel-Elektrophorese

10% Bleiche oder ähnliches Reinigungsmittel

7 Reagenzienvorbereitung

Alle Reagenzien dieses Kits sind gebrauchsfertig. Einige Komponenten müssen vor Gebrauch aufgetaut, mit dem Vortexer gemischt oder in einer Mikrozentrifuge zentrifugiert werden. Einzelheiten siehe weiter unten unter **Testverfahren**. Reagenzien müssen zur Herstellung von Master-Mix und Reaktionsgemischen gemischt werden. Eine genaue Anleitung finden Sie im Abschnitt **Testverfahren**.

8 Lagerung und Haltbarkeit

Das Kit muss bis zu seinem Gebrauch zwischen -18 °C und -25 °C in einem Gefrierschrank mit konstanter Temperatur aufbewahrt werden. Achten Sie bei jedem erhaltenen Kit auf das Verfallsdatum. Das Kit nicht mehr verwenden, wenn das Verfallsdatum überschritten ist.

Das in Schritt 7 des **SURVEYOR Nuclease-Verdaus** vorbereitete SURVEYOR Nuclease-Reaktionsgemisch muss **sofort** verwendet werden, da die Anwesenheit bestimmter Komponenten im SURVEYOR Nuclease-Reaktionsgemisch die SURVEYOR Nuclease W mit der Zeit inaktiviert.

9 Warnhinweise & Vorsichtsmaßnahmen

Keines der Reagenzien in diesem Kit stellt in den gelieferten Mengen eine Gesundheitsgefährdung dar. Die Dokumentennummer der Transgenomic MSD-710104 steht als Download zur Verfügung:

http://world.transgenomic.com/files/literature/710104-DE.pdf

Dieses Kit enthält keine Substanzen tierischen oder menschlichen Ursprungs, die ein Infektionsrisiko darstellen können.

Dieses Kit darf nur von Personen verwendet werden, die in den entsprechenden Labortechniken ausgebildet wurden. Beim Arbeiten mit den Kitkomponenten immer einen geeigneten Laborkittel, Einmalhandschuhe und Augenschutz tragen. Nach dem Gebrauch müssen die Kitkomponenten als klinischer Abfall und gemäß der für sie anwendbaren Gesetze und Verordnungen entsorgt werden.

Aus den Gefäßen pipettierte Reagenzienaliquots dieses Kits sind nur zum einmaligen Gebrauch bestimmt. Es konnte validiert werden, dass Kitkomponenten auch nach 25 Auftau-/Einfrierzyklen noch stabil sind. Verwenden Sie das Kit nicht, wenn diese Anzahl Zyklen überschritten wurde.

10 Primäre Probenentnahme, Handhabung und Lagerung

Das SURVEYOR Scan *KRAS* Kit Exons 2 CE IVD für das DHPLC-System benötigt DNA, die aus formalinfixierten, paraffineingebetteten (FFPE) kolorektalen Tumorproben extrahiert wurde. Für eine optimale DNA-Extraktion muss das Gewebe 14-24 Stunden in Formalin fixiert werden.

Tumorbiopsien sind eine heterogene Mischung aus Tumorzellen und Nicht-Tumorzellen. Außerdem ist der Tumor an sich eine heterogene Mischung aus Tumorzellen **mit** Mutationen und Tumorzellen **ohne** Mutationen. Da diese somatischen Mutationen möglicherweise nicht gleichmäßig im Tumor verteilt sind, kann die aus verschiedenen Bereichen desselben Tumors resultierende Mutationsanalyse unterschiedlich ausfallen. Um die Wahrscheinlichkeit für einen Mutationsnachweis zu erhöhen, sollte die DNA aus der Tumorregion des Gewebes isoliert werden, indem nur der Tumorbereich von dem Glasobjektträger abgeschabt wird. Dazu für jeden neuen Objektträger ein frisches, steriles Skalpell verwenden.

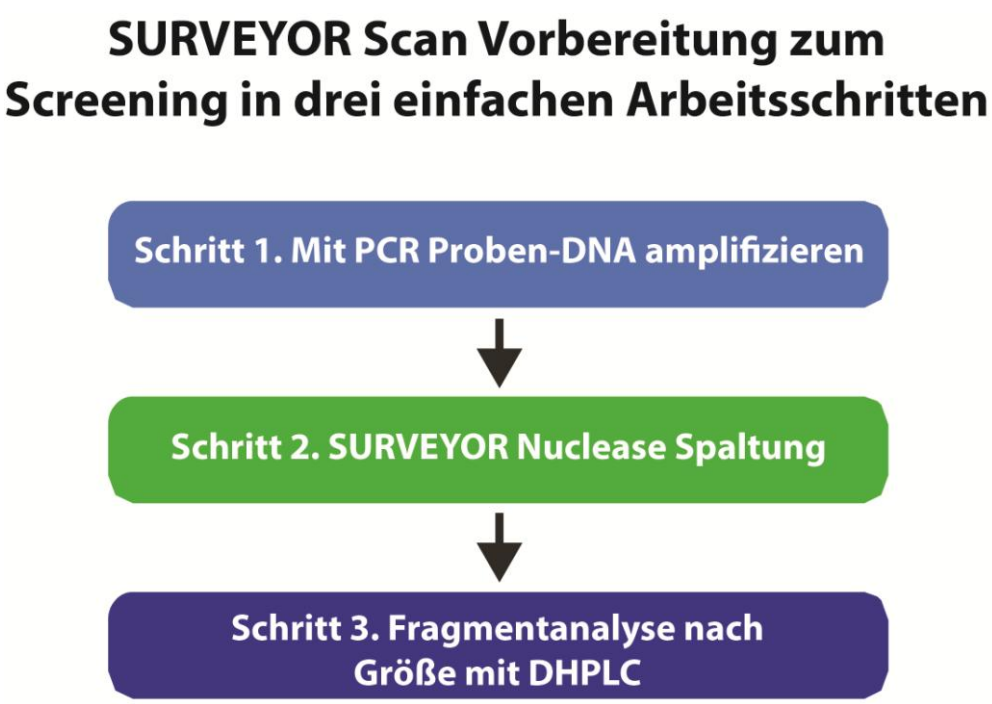
Für eine erfolgreiche Verwendung dieses Kits sollte die entnommene DNA den Kriterien entsprechen, die in den ***Überlegungen zu den Matrizen*** aufgelistet sind.

ANMERKUNG: Entnommene DNA-Proben, die mit diesem Kit nicht sofort analysiert werden, müssen bei -20 °C bis -80 °C eingefroren aufbewahrt werden.

11 Testverfahren

11.1 Somatischer Mutationsnachweis mit SURVEYOR Scan Kits – Ein Überblick

Nachweis und Bestätigung einer Mutation mit der SURVEYOR Nuclease umfasst drei Schritte:


SURVEYOR Scan Vorbereitung zum Screening in drei einfachen Arbeitsschritten
Schritt 1. Mit PCR Proben-DNA amplifizieren
Schritt 2. SURVEYOR Nuclease Spaltung
Schritt 3. Fragmentanalyse nach Größe mit DHPLC

Schritt 1 – Vorbereiten der PCR-Amplikons aus mutanter (Test) und normaler (Referenz) DNA. Anschließend an den letzten PCR-Amplifikationszyklus wird zum Aufschmelzen sämtlicher Doppelstränge das PCR-Produkt erhitzt und dann zur optimalen Bildung von Hetero- und Homoduplices langsam abgekühlt (Heteroduplices kommen vor, wenn ein Strang einer Wild-Type-Sequenz mit einem Strang einer mutanten Sequenz hybridisiert).

Schritt 2 – Behandlung des hybridisierten Heteroduplex-Homoduplex-Gemischs mit SURVEYOR Nuclease. SURVEYOR Nuclease schneidet beide Stränge der Hetereroduplex-DNA und lässt DNA-Fragmente entstehen. Die gleichbehandelte Control Wild-Type-DNA dient als Hintergrundkontrolle.

Schritt 3 – Analyse der DNA-Fragmente mit dem DHPLC-System. Die Bildung neuer Spaltprodukte aufgrund von einem (bzw. mehreren) Mismatch wird durch zusätzliche chromatografische Peaks angezeigt. Die Retentionszeit der Spaltprodukte weist auf die Größe der Fragmente und daher den ungefähren Ort des/der Mismatches hin.

12 Schritt-für-Schritt-Anleitung

12.1 DHPLC Grundeinstellung/Kalibration

Bei der Vorbereitung der SURVEYOR Nuclease-Platte zur Analyse mit dem DHPLC schlagen Sie bitte nach im ***Anhang A.3 HPLC (*DHPLC*) Systemanforderungen für die Denaturierung.***

12.2 Überlegungen vor Beginn der *KRAS*-Probenanalyse

Bevor Sie Proben auf einem DHPLC-System laufen lassen, muss ein geeigneter DNA-Größenstandard getestet werden, um zu gewährleisten, dass das System einwandfrei funktioniert. Das Laborpersonal, das mit dem Instrument arbeitet, sollte vor Durchführung der Analyse die Qualität mit dem DNA-Größenstandards prüfen.

12.3 Überlegungen zu den Matrizen

1. Verwenden Sie für die FFPE-isolierte Matrizen-DNA die üblichen Labortechniken, um die Qualität und Quantität der extrahierten DNA zu bewerten, und um zu gewährleisten, dass für die PCR ausreichend Matrize vorhanden ist.
2. Das 260:280 Absorptionsverhältnis muss größer als 1,80 sein.
3. Um das PCR-Setup zu beschleunigen, stellen Sie die Gebrauchskonzentration der Matrize auf ungefähr 12,5 ng/µL ein. Verdünnen Sie bei Bedarf die Matrizen-DNA mit hochreinem Wasser für die Molekularbiologie.

12.4 Überlegungen zum Arbeitsablauf

Das Kit ist für die Analyse von 100 Reaktionen ausgelegt. Kleinere Probenserien können ausgeführt werden, aber die Kit-Kontrollen und eine “No Template Control" müssen bei jeder Probenserie mitgeführt werden. Im Kit ist ausreichend Kontrollmaterial für 100 Reaktionen aller Kombinationen der zu verwendenden Probenseriengrößen vorhanden.

Im Allgemeinen sollte die Probenverarbeitung von Anfang bis Ende so ausgeführt werden, wie in dieser Bedienungsanleitung beschrieben. Wenn die Verarbeitung einer Probe vor der Fertigstellung aller Schritte unterbrochen werden muss, sollte die DNA bei angegebener Stelle bei -20 °C gelagert werden. Allerdings sollten gefrorene Proben nicht wiederholten Einfrier-/Auftauzyklen ausgesetzt werden, und die Tiefkühllagerung (-18 bis -25 °C) von PCR-amplifizierter DNA bzw. SURVEYOR Nuclease-Verdauprodukten über einen Zeitraum (>1 Woche) sollte vermieden werden.

Die Probenanalyse sollte dem unten aufgeführten Arbeitsablauf folgen:

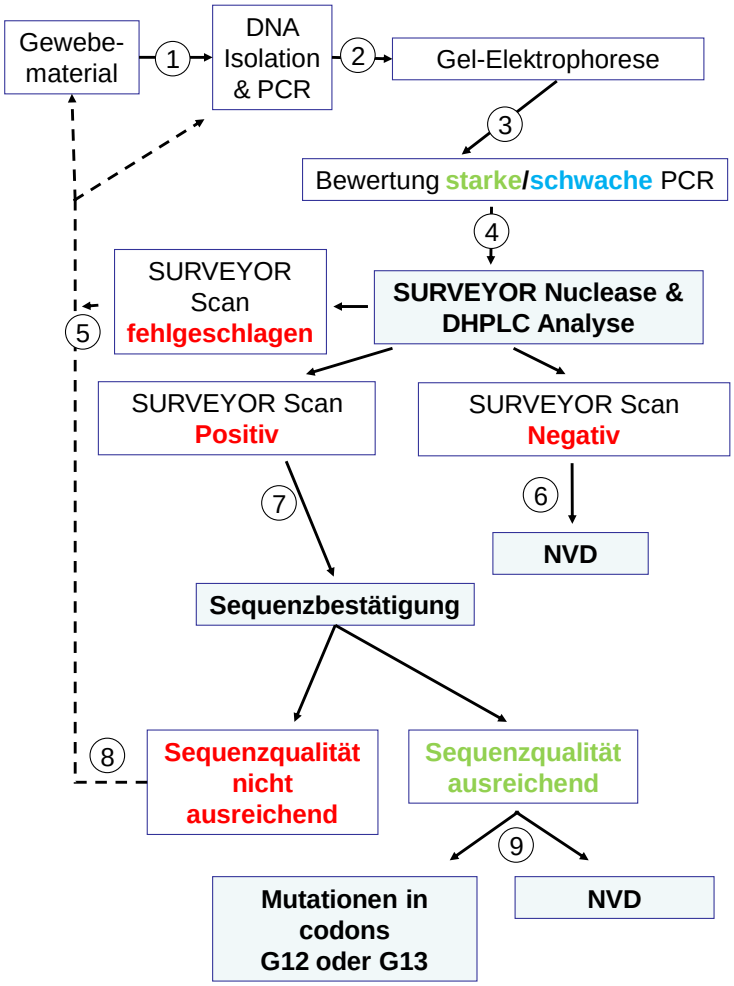


Abbildung 3 Arbeitsablauf der SURVEYOR Scan *KRAS* Kit Analyse

Anmerkungen zu Abbildung 3

1. Isolieren Sie die DNA von FFPE und verwenden Sie dazu Standardlabortechniken.
2. Führen Sie die PCR durch und prüfen Sie die DNA-Qualität durch Gelelektrophorese.
3. Dokumentieren Sie, ob die Bande **stark** (≥20 ng) oder **schwach** (<20 ng) ist.

Bereiten Sie aus FFPE frische genomische DNA vor, wenn mehrere PCR-Banden vorliegen.

4. Bei Proben, die nach der PCR-Amplifizierung als **starke PCR** bzw. **schwache PCR** bewertet wurden, kann die Behandlung mit SURVEYOR Nuclease und Analyse mit dem DHPLC-System angeschlossen werden.

   Beachten Sie, dass mit einer schwachen PCR-Zuordnung unzureichende DNA für das Erzielen aussagefähiger Ergebnisse mit DHPLC, aber genug DNA für die Sequenzierung vorhanden sein kann.

5. Siehe ***Anhang B – Fehlersuche*** für Beispiele fehlgeschlagener SURVEYOR Scan-Ergebnisse. Alle Proben mit dem Ergebnis SURVEYOR Scan fehlgeschlagen sollten noch mal neu bearbeitet werden:
   a. Wenn noch ausreichend genomische DNA vorhanden ist, die PCR wiederholen.
   b. Aus FFPE erneut DNA extrahieren; dies muss die zweite Wahl sein, da es normalerweise nicht wünschenswert ist, einen FFPE–Block nachzuschneiden.
   c. Wenn ein anderer Gewebeschnitt oder -Block verwendet wird, muss der gesamte Test wiederholt werden, da es aufgrund der Tumorheterogenität zu Abweichungen im Verdau kommen kann.
6. Wenn keine Spalt-Peaks sichtbar sind, für den SURVEYOR Scan ein negatives Ergebnis angeben, d. h. NVD = No Variant Detected (keine Variante nachgewiesen).
7. Wenn eine Probe SURVEYOR Nuclease Spaltprodukte anzeigt (entspricht nicht der jeweiligen Wild-Type Control), sollte sie zur Sequenzbestätigung gesandt werden..
8. Wenn die Sequenzbestätigung nicht erfolgreich ist, dann:
   a. Wenn noch ausreichend genomische DNA vorhanden ist, die PCR wiederholen.
   b. Aus FFPE erneut DNA extrahieren; dies muss die zweite Wahl sein, da es normalerweise nicht wünschenswert ist, einen FFPE–Block nachzuschneiden.
9. Bei einer akzeptablen Bestätigungsanalyse sollte eines der folgenden Resultate zutreffen:
   a. Wild-Type-Sequenz, das heißt No Variant Detected (NVD, keine Variante nachgewiesen), oder
   b. Variant Detected (Variante nachgewiesen). Wenn die Sequenzbestätigung eine Änderung der Basensequenz anzeigt, die zu einer Veränderung einer Aminosäure führt bei:
      i. Codon 12 oder
      ii. Codon 13

   ist dies als *KRAS*-Mutation positiv zu bewerten.

Anmerkung: Es ist möglich, eine positive SURVEYOR Scan-Zuordnung zu haben, die bei der Sequenzbestätigung in "No Variant Detected" (keine Variante festgestellt) ergibt. Die Nachweisgrenze (Level of Detection, LoD) der SURVEYOR Nuclease für ein DHPLC-System i betraegt fuer einige Mutationen 2% Mutation in 98% Wild-Type-DNA, wohingegen die LoD der Sequenzierung circa 10-25% Mutation in 90-75% Wild-Type-DNA beträgt.

Anmerkung: Wenn eine Probe 100% mutante DNA ist, können keine Heteroduplices gebildet werden und die Probe erscheint als "Wild-Type". Proben aus Tumorbiopsien enthalten allerdings aufgrund der Tumorheterogenität und/oder kontaminierendem normalen Gewebe Wild-Type-Zellen; mit diesem Kit sind 5% Wild-Type nachweisbar. Ein Ergebnis mit 5% mutanter DNA wuerde identisch erscheinen.

Anmerkung: Positive SURVEYOR Scan-Ergebnisse können sich aufgrund von Veränderungen in der Basensequenz von denen unterscheiden, die *KRAS*-aktivierend sind. Obwohl diese Mutationen selten sind, ist eine Bestätigung durch eine andere Methode (z. B. DNA-Sequenzierung) erforderlich, um festzustellen, ob ein positives SURVEYOR Scan-Ergebnis tatsächlich eine *KRAS*-aktivierende Mutation ist.

Anmerkung: Das Formalinfixierungsverfahren, das für die Vorbereitung von FFPE-Tumorbiopsieproben verwendet wird, kann zu einer Cytosin-Desaminierung führen. Diese Desaminierung wandelt Cytosin in Uracil um. Die Polymerase „liest“ dieses Uracil als ein Thymin und bindet ein Adenin in die duplizierten Stränge ein. Dies scheint dann eine Mutation zu sein, bei der das normale G jetzt durch ein A ersetzt wird und eine G/C- zu A/T-Mutation verursacht, die eine Artefaktmutation durch den Fixierungsprozess und keine echte somatische Mutation ist. Diese Vorfälle sind selten, Falls sie jedoch in einem fruehen PCR Zyklus auftreten sehen sie wie Mutationen aus. Bei einer erneuten Amplifikation sollten sie nicht auftreten Beispiele für mögliche Cytosin-Desaminierungsmutationen, die für eine Bestimmung der Patiententherapie herangezogen würden, sind:

- Codon 12: AGT (G12S) und GAT (G12D)
- Codon 13: AGC (G13S), GAC (G13D) und GGT (G13G, eine stille Mutation)

Daher wird empfohlen, dass alle diese Mutationen durch Doppelanalyse für dieselbe genomische DNA bestätigt oder alle Proben ab Analysebeginn im Doppelansatz durchgeführt werden.

12.5 Amplifikationsprotokoll

1. Die vorgemischte dNTP-Lösung (PN 703065) von Transgenomic wird in einer Gebrauchskonzentration von 10 mM Gesamtdeoxynucleotid (je 2,5 mM der vier Deoxynucleotide) geliefert.
2. Die *KRAS* Exon 2 Forward und Reverse -PCR-Primer (PN 710155F und 710155R) sind 10 µM.
3. Nehmen Sie die 10 µM Primerloesung, 10 mM dNTPs und den DNA Polymerase 10X PCR Buffer (PN 703315) aus dem Gefrierschrank und lassen alles auf Eis auftauen.
4. Nach dem Auftauen: Mischen Sie alle Kit-Komponenten im Vortexer (~10 Sekunden) zentrifugieren Sie kurz an (~10 Sekunden), um zu gewährleisten, dass keine Flüssigkeit an den Behälterdeckeln bleibt, und lagern Sie sie auf Eis.
5. Bereiten Sie auf Eis den Master-Mix vor.
6. Bereiten Sie einen Master-Mix für *KRAS* Exon 2-Reaktionen anhand der folgenden Tabelle vor:

Anzahl der Reaktionen:	**10**
Volumenberechnung:	
Volumen Wasser (µL)	**330****
DNA Polymerase 10X PCR Buffer (µL)	50
dNTPs (µL)	40
KRAS Primer Exon 2 Forward (µL)	25
KRAS Primer Exon 2 Reverse (µL)	25
DNA Polymerase (µL)	10
Master-Mix-Gesamtvolumen	**48,0**

****Anmerkung: Der Anwender sollte auf ein Minimum von 25 ng DNA je 50 µL Reaktion abzielen.** Erhöhen Sie für extrahierte DNA-Konzentrationen mit weniger als 12,5 ng/µL proportional das Volumen extrahierter DNA, um je Reaktion 25 ng zu erhalten. Reduzieren Sie auch das Volumen an Wasser in dem Master-Mix um dieselbe Menge, um je Reaktion 50 µL zu erhalten. **Alle mit diesem Master-Mix vorbereiteten Proben brauchen extrahierte DNA, die auf annähernd dasselbe niedrigste Konzentrationsniveau verdünnt ist.** Es ist nicht empfehlenswert, Konzentrationen extrahierter DNA mit weniger als 5 ng/µL einzusetzen.

7. Berechnen Sie die erforderlichen Volumina für alle Master-Mix-Lösungen anhand der Tabelle oben. Beachten Sie dabei Folgendes:

   Für diesen Master Mix werden drei zusätzliche Reaktionen benötigt für *KRAS* Control Wild-Type, *KRAS* Positive Control Exon 2 und die *KRAS* Exon 2 No Template Control (NTC).

Anmerkung: Berücksichtigen Sie, dass etwas mehr Master-Mix als in dieser Berechnung angegeben benötigt wird, um Verluste während des Pipettierens auszugleichen.

8. Beschriften Sie 0,2-mL-PCR-Reaktionsgefäße oder die Vertiefungen einer 96-Loch-Mikrotiterplatte mit den erforderlichen Probeninformationen.
9. Beschriften Sie ein 2,0-mL-Zentrifugenröhrchen für den vorbereiteten Master-Mix.
10. Fügen Sie diesen 2,0-mL-Zentrifugenröhrchen mit der Beschriftung „Master-Mix“ das erforderliche Volumen an hoch reinem Wasser für die Molekularbiologie hinzu.
11. Fügen Sie dem Master-Mix-Röhrchen die erforderliche Menge DNA Polymerase 10X PCR Buffer hinzu.
12. Fügen Sie denm Master-Mix-Reaktionsgefäß das erforderliche Volumen an 10 mM dNTPs hinzu.
13. Fügen Sie den jeweiligen Master-Mix-Reaktionsgefäß das erforderliche Volumen *KRAS* Forward Primer hinzu.
14. Fügen Sie den jeweiligen Master-Mix-Reaktionsgefäß das erforderliche Volumen *KRAS* Reverse Primer hinzu.
15. Nehmen Sie die DNA Polymerase (PN 703310) aus dem Gefrierschrank.
16. Zentrifugieren Sie die DNA Polymerase für ~10 Sekunden.
17. Mischen Sie die DNA Polymerase für ~10 Sekunden mit dem Vortexer.
18. Fügen Sie dem Master-Mix-Reaktionsgefäß das erforderliche Volumen DNA Polymerase hinzu.
19. Schließen Sie das Master-Mix-Zentrifugenröhrchen mit dem Deckel.
20. Mischen Sie vor dem Gebrauch das Master-Mix-Zentrifugenröhrchen ~30 Sekunden mit dem Vortexer und zentrifugieren Sie es dann kurz ~10 Sekunden lang.
21. Lagern Sie es bis zum Gebrauch auf Eis.
22. Pipettieren Sie 48,0 µL (siehe Anmerkung oben in Schritt 6) Master-Mix in die entsprechenden Vertiefungen. Wechseln Sie bei Verwendung einer Einkanalpipette jedes Mal die Spitze. Wenn Sie eine Dispenserpipette verwenden, achten Sie darauf, dass von Vertiefung zu Vertiefung nichts verspritzt wird. Halten Sie die Platte auf Eis.
23. Fügen Sie in die entsprechenden Vertiefungen 2,0 µL (siehe Anmerkung oben in Schritt 6) der Probenmatrizen-DNAs oder Wasser (No Template Control, NTC) hinzu. Verwenden Sie neue Pipettenspitzen für jede Probe und vermeiden Sie die Kreuzkontamination durch Verspritzen. Verschließen Sie die Vertiefungen mit den Proben-DNAs und dem NTC mit dem 8er Cap Strips (bei Verwendung einer 96-Loch-Mikrotiterplatte) bzw. die 0,2-mL-PCR-Reaktionsgefäße mit ihren Deckeln. Vergewissern Sie sich, dass die Deckel fest verschlossen sind.
24. Öffnen Sie erst jetzt die Reaktionsgefäße mit den Kontrollmatrizen-DNAs (PNs 710131, 710135) – und zwar eines nach dem anderen. Pipettieren Sie diese Kontrollmatrizen zuletzt, um das Risiko einer Kontamination der Proben-DNA zu verringern. Verschließen Sie jede Vertiefung wieder mit den 8er Cap Strips (wenn Sie eine 96-Loch-Mikrotiterplatte verwenden) bzw. schließen die 0,2-mL-PCR-Reaktionsgefäße mit dem Deckel. Vergewissern Sie sich, dass die Deckel fest verschlossen sind.

    ANMERKUNG: Zur guten Laborpraxis gehört, die No Template Controls (NTC) in Vertiefungen zu geben, die an Positive Control oder Proben angrenzen.

ANMERKUNG: Als Vorschlag, wie 96-Loch-Mikrotiterplatte für die Analyse von *KRAS* und *NRAS* Exon 2–4 anzulegen ist, siehe ***Anhang A.1 Plattenlayout für SURVEYOR Scan Kits***.

25. Vortexen Sie (~1/2 Geschwindigkeit) 10 Sekunden lang.
26. Zentrifugieren Sie 1-2 Minuten lang, um zu garantieren, dass alle Lösungen auf dem Boden der Vertiefung oder der Röhrchen gesammelt werden. Vergewissern Sie sich, dass alle Lösungen auf dem Boden jeder Vertiefung bzw. jeden Reaktionsgefäßes sind. Wenn dies nicht der Fall ist, wiederholen Sie die Zentrifugation.

12.7 Thermocycler-Programm für Amplifikationsprotokoll

1. Verwenden Sie folgendes Thermocycler-Protokoll für die PCR-Amplifikation und Heteroduplex-Bildung:

Initiale Denaturierung		
	95 °C	5 Minuten
Touchdown-Amplifikation		
15 Zyklen	95 °C 62 °C, -0,5 ºC/Zyklus 72 °C	30 Sekunden 30 Sekunden 25 Sekunden
Amplifikation		
30 Zyklen	95 °C 55 °C 72 °C	30 Sekunden 30 Sekunden 25 Sekunden
Finale Extension		
1 Zyklus	72 °C	2 Minuten
Heteroduplex-Bildung		
	95 ºC	2 Minuten
	≤12 °C	Hold

12.8 Qualitätskontrolle der PCR-Produkte

1. Bevor Sie mit dem SURVEYOR Nuclease-Verdau fortfahren, müssen Qualität und Quantität des Amplikons durch Gelelektrophorese (oder äquivalente Mittel) geprüft werden.
2. Analysieren Sie ein Aliquot des PCR-Produkts zusammen mit mehreren verschiedenen Mengen einer 100-bp DNA-Basenpaarleiter.
3. Verwenden Sie die Basenpaarleiter, um die Konzentration amplifizierter DNA zu berechnen.
4. Es sollte nur ein Fragment mit der zu erwartetenden Groesse des Haupt-PCR-Produkts in einer Konzentration von mehr als 20 ng/ul gefunden werden.
5. Falls mehrere Bande vorhanden sind, vergewissern Sie sich, dass die Qualität der Eingangsmatrizen-DNA ausreichend war (siehe ***Anhang B – Fehlersuche***).
6. Falls kein Produkt zu sehen ist, vergewissern Sie sich, dass die Qualität der Ausgangs - DNA ausreichend war (siehe ***Anhang B – Fehlersuche***). Wenn die Qualität den Spezifikationen entspricht, erhöhen Sie das Volumen der Matrize auf 4,0 µL je 50 µL Reaktion (Verhältnis von Wasser zu Reaktion auf 31,0 µL reduzieren).
7. In der No Template Control dürfen keine PCR-Produkte zu sehen sein. Wenn bei dieser Kontrolle DNA-Produkte nachweisbar sind, liegt wahrscheinlich eine Kontamination vor (siehe ***Anhang B – Fehlersuche***).
8. Bewerten Sie die PCR als „starke“ PCR oder „schwache“ PCR.
    a. Eine „starke“ PCR muss eine Einzelbande haben, die gleich oder größer als 20 ng/µL ist.
    b. Eine „schwache“ PCR muss eine Einzelbande haben, die kleiner als 20 ng/µL ist.

c. Führen Sie den SURVEYOR Nuclease-Verdau sowohl mit "starken" als auch "schwachen" PCR-Ergebnissen durch.

TIPP: In dieser Phase können PCR-Produkte bei unter bzw. gleich -20 ºC bis zu einer Woche gelagert werden.

12.9 SURVEYOR Nuclease Verdau

1. Nachdem sich die Proben-PCR in Qualität und Quantität als ausreichend erwiesen hat, führen Sie die SURVEYOR Nuclease-Verdaureaktion wie nachstehend beschrieben durch.
2. Tauen Sie die Reaktionsgefäße mit 0.15 M $MgCl_2$ Solution und den SURVEYOR Enhancer Cofactor auf Eis auf.
3. Geben Sie 10,0 µL von allen oben genannten PCR-amplifizierten Proben in ein neues 0,2 mL-PCR-Reaktionsgefäß oder in die Vertiefung einer 96-Loch-Mikrotiterplatte.
4. Bereiten Sie frisch eine Mischung aus 0.15 M $MgCl_2$ Solution, SURVEYOR Enhancer Cofactor, SURVEYOR Enhancer W2 und SURVEYOR Nuclease W (SURVEYOR Nuclease-Gemisch) zu.

Bereiten Sie anhand der folgenden Tabelle den SURVEYOR Nuclease Digest Master Mix für die Analyse mehrerer Proben vor. Das Beispiel unten zeigt die Volumina für ein 10-Proben-Master Mix.

Berücksichtigen Sie, dass etwas mehr Master-Mix, als in dieser Berechnung angezeigt, benötigt wird, um Verluste während des Pipettierens auszugleichen.

Anzahl der SURVEYOR Nuclease-Verdaureaktionen:	**10**
Volumenberechnung:	
0.15 M $MgCl_2$ Solution (µL)	**10,0**
SURVEYOR Enhancer Cofactor (µL)	**10,0**
SURVEYOR Enhancer W2 (µL)	**10,0**
SURVEYOR Nuclease W (µL)	**20,0**
Master-Mix-Gesamtvolumen	**50,0**
Fügen Sie je **5 µL** SURVEYOR Nuclease Master-Mix den einzelnen PCR-amplifizierten Proben hinzu (µL).	**10,0**
Gesamtvolumen SURVEYOR Nuclease-Verdaureaktion:	**15,0**

a. Vor dem Gebrauch alle Reagenzien zentrifugieren.

b. Vor dem Pipettieren jedes Reagenz leicht vortexen. Zentrifugieren Sie nach jedem Vortexschritt ~10 Sekunden leicht an.

c. Fügen Sie für jeden Verdau einem 0,2-mL (oder größeren) PCR-Reaktionsgefäß folgende Komponenten hinzu.

1,0 µL 0.15 M $MgCl_2$ Solution (PN 708027)
1,0 µL SURVEYOR Enhancer Cofactor (PN 708049)
1,0 µL SURVEYOR Enhancer W2 (PN 710161)
2,0 µL SURVEYOR Nuclease W (PN 710160)

Oder fügen Sie 5 µL Master-Mix hinzu, der wie in der Tabelle oben vorbereitet wurde.

5. Vortexen Sie den SURVEYOR Nuclease Digest Master Mix 10 Sekunden bei niedriger Geschwindigkeit.
6. Zentrifugieren Sie den SURVEYOR Nuclease Digest Master Mix 10 Sekunden bei niedriger Geschwindigkeit.
7. Legen Sie den SURVEYOR Nuclease Digest Master Mix bis zur Weiterverarbeitung auf Eis.

Anmerkung: Der in Schritt 7 vorbereitete SURVEYOR Nuclease Digest Master Mix muss sofort verwendet werden, da SURVEYOR Nuclease W mit der Zeit inaktiv wird, wenn sie mit den anderen Komponenten des SURVEYOR Nuclease Digest Master Mix in Berührung kommt.

8. Pipettieren Sie je 5,0 µL Aliquot des SURVEYOR Nuclease Master Mix in jedes Reaktionsgefäß bzw. jede Vertiefung, das bzw. die 10,0 µL Aliquot des amplifizierten PCR-Produkts enthält (siehe Schritt 3 oben).
9. Wenn Sie mit dem Pipettieren fertig sind, zentrifugieren Sie die 0,2-mL-PCR-Reaktionsgefäße bzw. die 96-Loch-Mikrotiterplatte 10 Sekunden lang.
10. Vortexen Sie die 0,2-mL-PCR-Reaktionsgefäße bzw. die 96-Loch-Mikrotiterplatte vorsichtig 10 Sekunden lang.
11. Zentrifugieren Sie 10 Sekunden bei niedriger Geschwindigkeit (dieser Schritt ist besonders wichtig, wenn der Verdau in einem Instrument ohne beheizten Deckel durchgeführt wird).
12. Inkubieren Sie 30 Minuten lang bei 42 °C.
13. Fügen Sie jedem Röhrchen bzw. jeder Vertiefung 1,0 µL SURVEYOR Stop Solution (PN 708030) hinzu, leicht vortexen (das SURVEYOR Nuclease-Gesamtreaktionsvolumen beträgt 16,0 µL).

TIPP: Die SURVEYOR-Verdauprodukte können bei ≤ -20 ºC bis zu einer Woche gelagert werden.

14. Laden Sie die Probenverdaus auf das DHPLC-System.

Anmerkung: Empfohlene Gradienteneinstellungen für die Analyse von SURVEYOR Nuclease-Verdauprodukte mit dem DHPLC-System finden Sie auf http://world.transgenomic.com/diagnostic-tools/genetic-analysis-kits/crc-rascan-kits-eu/dhplcsystemsettings.

13 Kontrollverfahren

13.1 Qualitätskontrolle für das SURVEYOR Scan *KRAS* Kit Exon 2 CE IVD

Zur Qualitätskontrolle bestimmter Schritte des Testverfahrens sind diesem Kit Kontrollplasmid-DNAs beigefügt. Für das ***Amplifikationsprotokoll*** bieten diese Kontrollen ein Mittel zur Gewährleistung, dass der Master-Mix korrekt hergestellt ist und die Amplifikation richtig funktioniert hat. No Template Controls (wo anstelle der Matrizen-DNA Wasser hinzugefügt wird) werden ebenfalls empfohlen, um eine mögliche Kontamination der Kitkomponenten mit einer DNA-Matrize nachzuweisen.

Bei dem Schritt des SURVEYOR Nuclease-Verdaus zeigt das Amplikon der Kontrollplasmid-DNA, ob die Bedingungen der Spaltreaktion (Herstellung des SURVEYOR Nuclease Digest Master Mix und Inkubationsbedingungen) zufriedenstellend waren. Bei der Analyse liefern die Chromatogramme dieser SURVEYOR Nuclease verdauten Kontrollamplikons auf dem DHPLC-System einen Hinweis darauf, wo die Peaks der Spaltprodukte, die der Mutation in *KRAS* Exon 2 entsprechen, sogar bei geringer Konzentration, eluieren werden (siehe ***Abbildung 4-6***). Peaks von Spaltprodukten, die anderen Mutationen in *KRAS* Exons 2 entsprechen, können zu leicht unterschiedlichen Retentionszeiten eluieren.

Wenn die PCR-Amplikons nicht den Ergebnissen in *Abschnitt* ***Qualitätskontrolle der PCR-Produkte*** entsprechen, sehen Sie in ***Anhang B - Fehlersuche*** nach, oder setzen Sie sich mit dem Kundendienst von Transgenomic in Verbindung, bevor Sie weitere Schritte der Probenanalyse durchführen.

13.2 Verwendung von Kontrollplasmid-DNAs

Mit dem Kit werden zwei Kontroll-DNAs geliefert:

KRAS Control Wild-Type; PN 710131

KRAS Positive Control Exon 2; PN 710135

Diese Kontroll-DNAs sind Plasmide mit Insertionen. Die Positive Control enthält zwei Plasmide: eine Mischung aus *KRAS* Control Wild-Type und einem Mutationsklon, der sich vom Wild-Type in einem einzigen Basenpaar unterscheidet. Die Kontrollen werden in getrennten Reagenzgefäßen geliefert, jede mit einer Konzentration von 10^5 Kopien/µL.

Die für die PCR-Amplifikation benötigten *KRAS* Exon 2 Forward und Reverse PCR Primer werden im Kit getrennt geliefert. Bitte befolgen Sie für den Gebrauch dieser Kontrollen die Anleitungen in ***Amplifikationsprotokoll***, ***SURVEYOR Nuclease-Verdau*** und ***Analyse des KRAS Exon 2 mit der SURVEYOR Nuclease***.

PERSONEN, DIE DIESEN TEST ZUM ERSTEN MAL DURCHFÜHREN,WIRD DRINGEND EMPFOHLEN ZUNÄCHST TESTS MIT DEN KONTROLLEN DURCHZUFÜHREN, BEVOR SIE GENOMISCHE PROBEN BEARBEITEN.

14 Interpretation der Ergebnisse

14.1 Analyse des *KRAS* Exon 2 mit der SURVEYOR Nuclease

Führen Sie zu Vergleichs- und Kontrollzwecken bei allen Kontrollen (Wild-Type und Positive Controls), einer No Template Control sowie bei den Proben-DNAs **IMMER auch** den SURVEYOR Nuclease Verdau durch und analysieren sie diesen Verdau auf derselben Probenplatte auf dem DHPLC-System.

Beim SURVEYOR Nuclease-Verdau zeigen die Ergebnmisse dieser Kontrollplasmid-DNAs, ob die Bedingungen der Spaltreaktion (Herstellung des SURVEYOR Nuclease-Gemisches und Inkubationsbedingungen) zufriedenstellend waren. Bei der Analyse liefert das DHPLC-System Spuren dieser verdauten Kontrollamplikons der SURVEYOR Nuclease einen Anhaltspunkt, wo die DNA-Fragmente aus der Spaltung an diesen spezifischen Mutations-Mismatch-Stellen, auch bei geringer Konzentration, eluieren werden (siehe ***Abbildung 4***).

Wenn entweder die PCR-Amplikons oder die aus den Kontroll-DNAs stammenden SURVEYOR Nuclease-Spaltfragmente nicht den dargestellten Ergebnissen entsprechen, sehen Sie im ***Anhang B – Fehlersuche*** nach, oder wenden Sie sich an den technischen Kundendienst von Transgenomic, bevor Sie weitere Schritte der Probenanalyse durchführen.

Die Beispiele unten dienen nur zu Darstellungszwecken und dürfen **NICHT** verwendet werden, um die DNA-Sequenz einer gegebenen Mutation festzulegen. Die Bestätigung der der DNA-Sequenz einer Mutation ist erforderlich, um eindeutig die Präsenz einer spezifischen Basenänderung in Exon 2 des *KRAS*-Gens zu bestimmen.

SURVEYOR Nuclease spaltet an jedem Mismatch, das sich aus der Heteroduplex-Bildung von Wild-Type und Mutanten DNAs ergeben – nicht nur Mutationen in Exon 2. Die SURVEYOR Nuclease bestätigt, dass ein Mismatch vorhanden ist. Die mutationsspezifische DNA-Sequenz der Basenänderung ist zur Bestimmung des *KRAS*-Aktivierungsstatus erforderlich und muss durch eine zweite Methode (z. B. Sequenzierung) bestätigt werden.

14.2 Auswertung der SURVEYOR Scan-Ergebnisse

Überprüfen Sie die Chromatogramme und vergleichen Sie die Chromatogramme von Wild-Type und Positive Controls mit denen der Probe. Bestimmen Sie, ob das Chromatogramm der Probe mit dem Wild-Type-Muster übereinstimmt oder differiert. Wenn es sich unterscheidet, dann sollte die Probe als "SURVEYOR Scan positiv" bewertet und zur DNA-Sequenzbestätigung geschickt werden. Siehe Beispiele in ***Abbildung 4*** sowie ***Anhang B – Fehlersuche, Probleme 7 & 8*** für Beispiele solcher Proben.

Jede Probe mit einem SURVEYOR Nuclease-Muster, dass sich von dem des Wild-Type unterscheidet, sollte für eine Sequenzbestätigung eingeschickt werden, selbst wenn sie nicht mit der Kontrolle identisch ist Siehe ***Anhang B – Fehlersuche, Problem 7*** für ein Beispiel einer solchen Probe.

Falls erforderlich, vergrößern Sie bitte den Bildausschnitt und überlagern Sie das Chromatogramm Ihrer Probe mit dem Chromatogramm der Wild-Type Control.

Vermerken Sie alle Unterschiede zwischen der Wild-Type Control und der analysierten Probe.

Wichtig! Für eine sorgfältige Prüfung jeder Probe sollte der Prüfer kontrollieren, ob nebeneinanderliegende Proben in der Analyseplatte identische positive SURVEYOR Scan Ergebnisse ausweisen. Das Auftreten identischer positiver Ergebnisse kann das Resultat einer Kreuzkontamination von Probe und Kontrolle sein. Die Analyse muss in diesem Fall wiederholt werden.

14.3 Beispielergebnisse

Abbildung 4a und ***4b*** zeigen Beispielergebnisse, die mit dem SURVEYOR Scan *KRAS* Kit Exon 2 CE IVD für DHPLC erzielt wurden.. Bei diesen Beispielen wurde unter Verwendung des WAVE® 4500 Systems mit UV- und Fluoreszenz-Detektoren das im Abschnitt ***Schritt-für-Schritt-Anleitung*** dargestellte Verfahren genau eingehalten. Für Hinweise zu empfohlenen Gradienteneinstellungen für die Analyse von SURVEYOR Nuclease-Verdauprodukten mit dem DHPLC-System, gehen Sie bitte auf http://world.transgenomic.com/diagnostic-tools/genetic-analysis-kits/crc-rascan-kits-eu/dhplcsystemsettings.

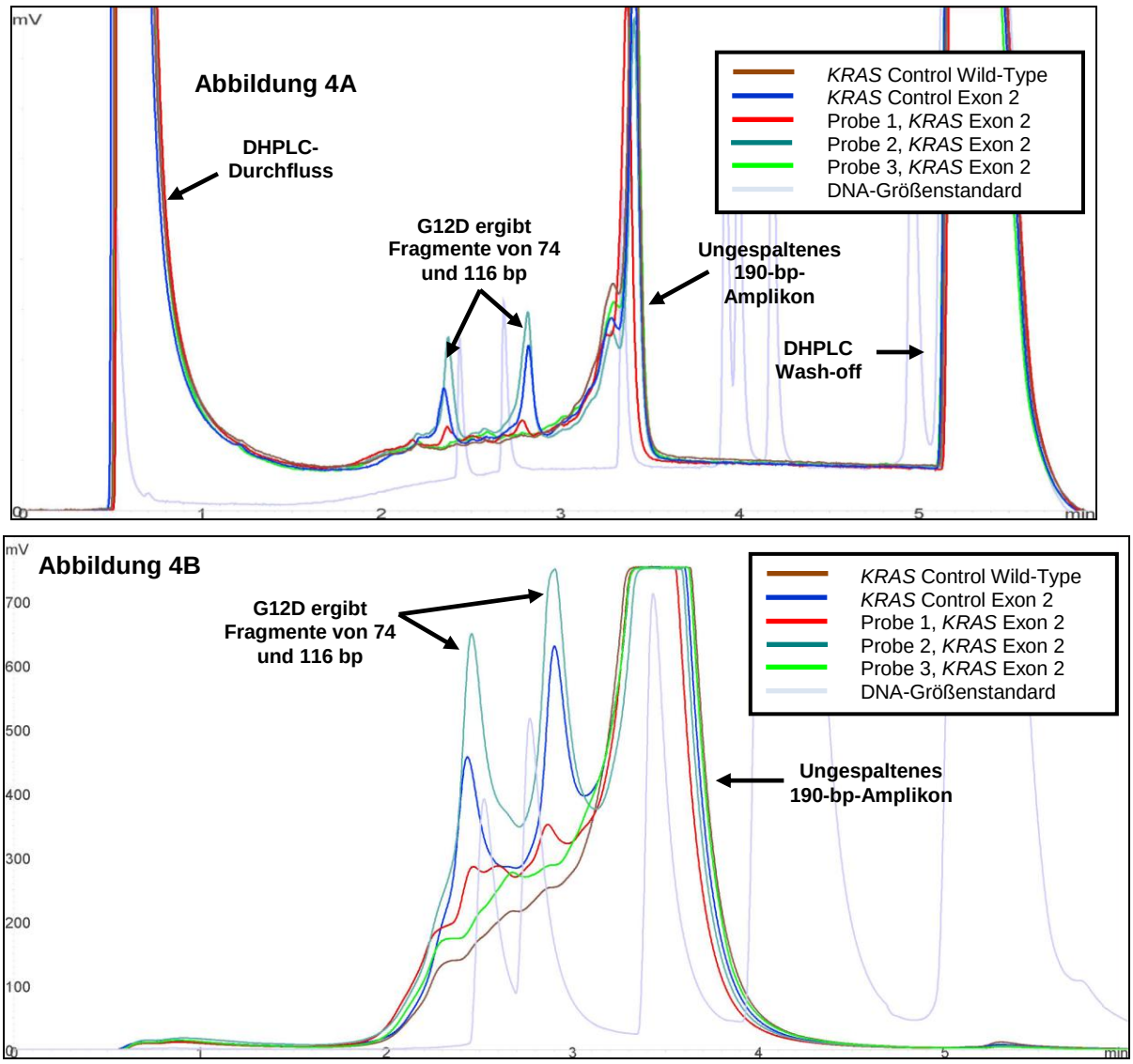


Abbildung 4A und 4B: WAVE DHPLC Analyse mit UV- (Abbildung 4A) und Fluoreszenz- (Abbildung 4B) Nachweis von SURVEYOR Nuclease Verdauungsprodukten von *KRAS* Positive Control Exon 2, *KRAS* Control Wild-Type und CRC DNA isoliert aus FFPE-Schnitten. Bei der Sichtprüfung der Chromatogramme sollten die verdauten Proben mit der Wild-Type Control (braune Linie) verglichen werden. Die *KRAS* Positive Control Exon 2 (blaue Linie) ist eine Mischung aus Wild-Type- und mutanten G12D-Plasmiden, die in Verdauungsprodukten mit 74 und 116 bp resultiert; Diese Kontrolle zeigt an, dass der SURVEYOR Nuclease Verdau funktioniert hat, und weist auf dem Chromatogramm auf die Region zur Sichtprüfung hin, die bestimmt, ob eine Probe zur DNA-Sequenzanalyse geschickt werden sollte. Beim Vergleich der Verdauungsmuster der Proben 1-3 mit dem Wild-Type, das im Chromatogramm unverdaut ist, ist es offensichtlich, dass Proben 1 und 2 (rote und türkisfarbene Linie) möglicherweise Mutationen enthalten und zur DNA-Sequenzanalyse geschickt werden sollten, um die Anwesenheit oder das Fehlen einer Mutation am entsprechenden Codon zu bestätigen. Die Probe 3 (grüne Linie) hat im Vergleich zur Wild-Type Control ähnliche Chromatogramme und muss nicht zur DNA-

Sequenzanalyse geschickt werden. Bitte beachten Sie, dass das Sequenzierungsergebnis das endgültige Ergebnis darstellt, da es in derselben Fragmentgröße weitere nicht relevante Mutationen geben kann.

15 Leistungsmerkmale

15.1 Nachweisgrenze von Mutationen mit SURVEYOR Scan-Kits

Die Validierung der SURVEYOR Scan Kits für DHPLC-Plattformen mit Plasmidklonen aller angezeigten Mutationen hat gezeigt, dass SURVEYOR Nuclease-Peaks in einer Konzentration von 2-5% mutierte DNA innerhalb von Wild-type DNA nachgewiesen werden können.

Der automatischen Sequenzierungszuordnung der Vorwärts- und auch Rückwärtsstränge gelingt es häufig nicht, Mutationen mit Werten unter 10% in Gemischen mit Wild-Type-DNA zu erfassen. Zusammen mit den SURVEYOR Nuclease-Ergebnissen ist es möglich, die 5-10% Sequenzierungselektropherogramme der Mutanten mit mehr Sicherheit zu interpretieren.

Wenn eine Probenanalyse ein positives SURVEYOR Scan-Ergebnis zeigt, aber mit der DNA-Sequenzierung keine *KRAS*- oder *NRAS*-Mutation detektiert wird, empfehlen wir, dass „Keine Variante erfasst“ als Ergebnis angegeben wird. Für weitere Einzelheiten siehe *Überlegungen zum Arbeitsablauf*.

15.2. Sequenzbestätigung

Für alle SURVEYOR Scan positiven Ergebnisse muß mit der Sequenzbestätigung fortgefahren werden, um die Sequenzidentität der *KRAS* Exon 2 Mutationen zu bestimmen.

Bei einem negativen Ergebnis des SURVEYOR Scans muss keine Sequenzbestätigung durchgeführt werden. Die Probe kann als Wild-Type oder "Keine Variante festgestellt" (No Variant Detected) angegeben werden.

Die in diesem Kit enthaltenen Universal Sequencing Primer können zur Sequenzbestätigung verwendet werden. Der Vorwärts-Primer hat die PN 710153F (Universal Sequencing Primer 1), der Rückwärts-Primer die PN 710153R (Universal Sequencing Primer 2).

15.3 Verfahrensbeschränkungen

Bei der Extraktion der formalinfixierten, paraffineingebetteten Proben übertragene Kontaminierungsstoffe können ebenfalls die PCR-Amplifikation und SURVEYOR Nuclease-Verdauungsvorgänge stören. Die in ***Verfahren zur Qualitätskontrolle*** beschriebenen Vorgehensweisen zur Qualitätskontrolle gewährleisten, dass die extrahierte DNA zur Verwendung mit diesem Kit geeignet ist.

Dieses Kit wurde für die Verwendung mit formalinfixierten, paraffineingebetteten Biopsieproben von Kolorektaltumoren validiert. Eine Validierung für eine Verwendung mit anderen Krebsarten oder frischen bzw. tiefgefrorenen Biopsieproben besteht nicht.

Zur Fehlersuche nicht standardmäßiger Ergebnisse und Einzelheiten zu Faktoren, die diesen Test beeinträchtigen können, siehe ***Anhang B – Fehlersuche*** weiter unten.

Bei diesem Kit muss besonders darauf geachtet werden, Übertragung und Kreuzkontamination zu vermeiden. Die hohe Empfindlichkeit der Testmethode erfordert besondere Vorsichtsmaßnahmen in folgenden Punkten:

- Achten Sie darauf, dass alle Proben so gehandhabt werden, dass eine Kreuzkontamination zwischen ihnen nicht vorkommen kann.
- Arbeiten Sie an einem PCR-Arbeitsplatz oder in einem anderen geeigneten Raum, wo der Arbeitsbereich vor dem Aufbau von PCR-Amplifikationsreaktionen UV-Licht ausgesetzt werden kann.
- Verwenden Sie einen getrennten PCR-Arbeitsplatz bzw. Raum, um die Proben nach der PCR-Amplifikation für die Qualitätskontrolle durch Gelelektrophorese zu öffnen.
- Der SURVEYOR Nuclease-Verdau sollte in einem Raum oder an einem PCR-Arbeitsplatz stattfinden, wo die erste PCR nicht stattgefunden hat.

- Achten Sie darauf, dass bei allen Testschritten die Plasmidkontrollen des Kits von den Testproben getrennt gehandhabt werden.
    - Stellen Sie sicher, dass alle Lösungen, No Template Controls und fertig pipettierte DNA-Proben verschlossen sind, bevor Sie die Reaktionsgefäße mit der Kontrollplasmid-DNA öffnen.
    - **DIE KONTROLLEN ZULETZT BEARBEITEN.** Fügen Sie den entsprechenden Reaktionsgefäßen erst dann Kontrollplasmid-DNA hinzu, NACHDEM ALLE anderen Reaktionsgefäße mit No Template Control und Proben verschlossen worden sind.
    - Wischen Sie ALLE Röhrchen und Verschlusskappen nach dem Verschließen der Kontroll-DNA-Röhrchen mit einem DNA-Zerstörungsmittel ab (z. B. 10% Bleichmittel), bevor Sie sie in einen anderen Bereich bringen.
- Achten Sie darauf, dass es beim Pipettieren in die 96-Proben-Mikrotiterplatte (beispielsweise durch Verspritzen während des Mischens oder durch nicht gewechselte Pipettenspitzen) nicht zu einer Kontamination der Proben in den angrenzenden Proben kommt.

Anhang A

A.1 Plattenlayout für SURVEYOR Scan Kits

Das vorgeschlagene Plattenlayout gilt für die gleichzeitige Durchführung aller sieben *KRAS* und *NRAS* Exons mit der SURVEYOR Scan Analyse für 10 Proben.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A: *KRAS* EX 2	*KRAS* Ex 2 WT	*KRAS* Ex 2 Mut	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	Probe 5	Probe 6	Probe 7	Probe 8	Probe 9	Probe 10
B: *KRAS* EX 3	*KRAS* Ex 3 WT	*KRAS* Ex 3 Mut										
C: *KRAS* EX 4A	*KRAS* Ex 4A WT	*KRAS* Ex 4A Mut										
D: *KRAS* Ex 4B	*KRAS* Ex 4B WT	*KRAS* Ex 4B Mut										
E: *NRAS* EX 2	*NRAS* Ex 2 WT	*NRAS* Ex 2 Mut										
F: *NRAS* Ex 3	*NRAS* Ex 3 WT	*NRAS* Ex 3 Mut										
G: *NRAS* Ex 4	*NRAS* Ex 4 WT	*NRAS* Ex 4 Mut										
H:	Leer	Leer	Leer	Leer	Leer	NTC *KRAS* Ex 2	NTC *KRAS* Ex 3	NTC *KRAS* Ex 4A	NTC *KRAS* Ex 4B	NTC *NRAS* Ex 2	NTC *NRAS* Ex 3	NTC *NRAS* Ex 4

Schlüssel: Ex = Exon; WT = Wild-Type; Mut = Mutation; NTC = No Template Control.

A.2 Kontroll-DNA-Stempel

Im Folgenden werden die Sequenzen mit einem "Stempel" angegeben.

Schlüssel: Die häufigsten Mutationsregionen sind **Violett** markiert. Die Sequenz in GROSSBUCHSTABEN stellen codierende Basen dar; die Sequenz in Kleinbuchstaben stellen nicht-codierende Basen dar.

Die Kontrollen haben genetische "Stempel", die **Gelb** markiert sind; diese Variationen von der *KRAS*-Wild-Type-Sequenz, in einem Bereich, in dem keine Mutationen erwartet werden, können verwendet werden, um Probleme mit der Probenkontamination durch Positive Controls zu erkennen. Siehe ***Anhang B - Fehlersuche***, ***Problem 8***, für ein Beispiel einer SURVEYOR Scan-Spur einer solchen Kontamination.

***KRAS* Exon 2 "Stempel"**

Amplikongröße: 190 bp. Für die Herstellung des genetischen Stempels des *KRAS* Exon 2 Kontrollplasmids wird `TAT` gegen `ATA` ausgetauscht. Codon 12 und 13 sind unten ebenfalls markiert.

GCTGGTGGCGTAGGCAAGAGTGCCTTGACGATACAGCTAATTCAGAATCATTTTGTGGACGAAATAGAT

A.3 HPLC (DHPLC) Systemanforderungen für die Denaturierung

A.3.1 DHPLC Spezifikationen für SURVEYOR Scan Anwendungen

Die folgenden Spezifikationen stellen die Mindestanforderungen für die DHPLC-Systemspezifikationen für die Durchführung der Tests mit dem SURVEYOR Scan *KRAS* & *NRAS* Kit dar.

Abgabesystem für Hochleistungslösungsmittelgradienten

- Binäre Gradientenkapazität; Hochdruck oder Niederdruck
- Durchflussregulierung, Mindestbereich: 0,7 – 1,6 mL/min
- Durchflussgenauigkeit: ± 2% (H_2O bei 20 ºC)
- Lösungsmittelentgaser

Autosampler bzw. Probengeber

- Temperaturregulierung zum Abkühlen der Platten, einstellbar: 4 bis 14 ºC
- Injektionsvolumen: 5–50 µL

Trennkartusche bzw. Trennsäule

- Entwickelt für die Größentrennung von dsDNA-Fragmenten, Fragmentgröße 50 bp bis 250 bp

Säulenofen mit hoch präziser Temperaturregelung

- Temperaturbereich: 40 bis 70 ºC
- Temperaturgenauigkeit: ± 0,2 ºC
- Temperaturreproduzierbarkeit: ± 0,2 ºC
- Linearität über vollständigen Temperaturbereich: ± 2,0 ºC

Alternative Nachweismethode 1

- **UV/VIS-Detektor**
  - Wellenlängenbereich 190 – 700 nm
  - UV-Quelle: Deuteriumlampe

Alternative Nachweismethode 2

- **Fluoreszenz-Detektor**
  - Wellenlängenbereich: Anregung: 200 – 850 nm; Emission: 250 – 900 nm
  - Fluoreszenzquelle: 150 W Xenonlampe
- **Pumpe für Fluoreszenzfarbstoff**
  - Feste Durchflussrate bei 0,1 mL/min – 20%/+50%
  - Pulsationsarmer Durchfluss

A.3.2 Systembetrieb

Zur Installation und Betrieb des DHPLC-Systems richten Sie sich nach den Empfehlungen des Herstellers zur Analyse von dsDNA-Fragmenten in der Größenordnung von 50 bp bis 250 bp mit einer Zielauflösung von mindestens 10 bp. Dies ist der Größenbereich für Fragmente nach SURVEYOR Nuclease-Verdau mit diesem Kit.

Für Hinweise zu empfohlenen Gradienteneinstellungen für die Analyse von SURVEYOR Nuclease-Verdauprodukten mit dem DHPLC-System, gehen Sie auf http://world.transgenomic.com/diagnostic-tools/genetic-analysis-kits/crc-rascan-kits-eu/dhplcsystemsettings.

A.3.3 Wartung der DHPLC Trennsäule

Für die Wartung der DHPLC Trennsäule befolgen Sie die Empfehlungen des Herstellers.

Anmerkung: Die Analyse von SURVEYOR Nuclease-Reaktionen erfordert häufigere und strengere Reinigungsprotokolle als bei der normalen PCR-Probenanalyse. Für weitere Einzelheiten siehe die Anweisungen Ihres DHPLC-Systems

A.4 Laborbedingungen für PCR-Tests

Um zuverlässige und kontaminationsfreie PCR-Ergebnisse zu erhalten, etablieren Sie bei der Einrichtung der PCR-Labors eine gute Laborpraxis.

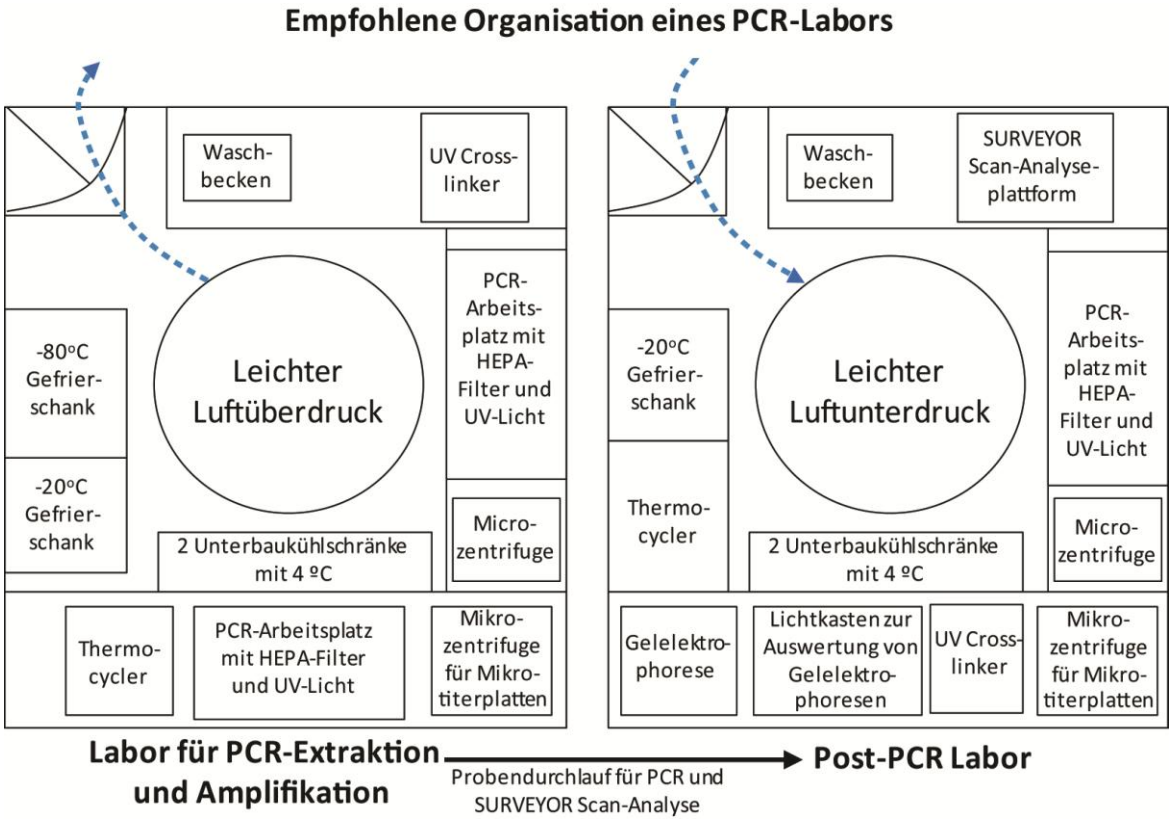
Denken Sie bei der Planung des Laboraufbaus an den Bedarf von räumlicher Trennung der Arbeitsbereiche PCR-Amplifikation und Post-Amplifikation. Es ist wichtig, Folgendes zu trennen: (i) DNA-Isolierung, (ii) PCR-Amplifikation und (iii) Post-PCR-Aktivitäten wie das Öffnen von amplifizierten Proben für die Durchführung von Gelelektrophoresen oder zum Vorbereiten anderer Tests wie SURVEYOR Nuclease-Verdau und DNA-Sequenzierung

Es ist auch wichtig, dass Laborverbrauchsmaterial und Laborausrüstung speziell für diese Arbeitsbereiche gekennzeichnet sind und ausschließlich in diesem Bereich verwendet werden. Abwischen von Oberflächen mit einem wöchentlich frisch zubereiteten Bleichmittel 10% (v/v) ist hilfreich bei der Elimination von DNA-Fragmenten ≤ 500 bp. Darüber hinaus kann es nützlich sein, Kunststoffprodukte und Lösungen 7-10 Minuten kurzwelliger UV-Strahlung auszusetzen.

Anmerkung: Enzyme und DNA die amplifiziert werden soll, **dürfen nicht** mit UV-Strahlung behandelt werden.

Zur Reduzierung von Kontamination vorschriftsmäßige Schutzkleidung tragen, häufig Handschuhe wechseln und, bevor man sich zum Arbeitsbereich begibt, die behandschuhten Hände mit 10% (v/v) Bleichmittel abwischen.

Die Einrichtung sollte zumindest der Zweiraumaufteilung in dem dargestellten Diagramm unten entsprechen, welches speziell für PCR und Analysen mit der SURVEYOR Nuclease entwickelt wurde.



A.5 Literaturnachweis

1. Amgen News Release (2013) New analyses identify predictive biomarkers for Vectibix® (panitumumab) in patients with metastatic colorectal cancer. http://wwwext.amgen.com/media/media_pr_detail.jsp?-year=2013&releaseID=1820728
2. Peeters M *et al* (2013) Massively parallel tumor multigene sequencing to evaluate response to panitumumab in a randomized phase III study of metastatic colorectal cancer. *Clin Cancer Res. 19 1902-12*
3. De Roock W *et al* (2010) Association of *KRAS* p.G13D mutation with outcome in patients with chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer treated with cetuximab. *JAMA 304 1812-20*
4. Peeters M *et al* (2013) Mutant *KRAS* codon 12 and 13 alleles in patients with metastatic colorectal cancer: assessment as prognostic and predictive biomarkers of response to panitumumab. *J Clin Oncol. 31 759-65*
5. Andre T *et al* (2013) Panitumumab combined with irinotecan for patients with *KRAS* wild-type metastatic colorectal cancer refractory to standard chemotherapy: a GERCOR efficacy, tolerance, and translational molecular study. *Ann Oncol. 24 412-9*
6. Loupakis F *et al* (2009) *KRAS* codon 61, 146 and *BRAF* mutations predict resistance to cetuximab plus irinotecan in *KRAS* codon 12 and 13 wild-type metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer 101 715-21*
7. De Roock W *et al* (2010) Effects of *KRAS*, *BRAF*, *NRAS*, and *PIK3CA* mutations on the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: a retrospective consortium analysis. *Lancet Oncol. 11 753-62*
8. Qiu P *et al* (2004) Mutation detection using Surveyor™ nuclease. *Biotechniques 36 702-707*
9. Kuang Y *et al* (2009) Noninvasive detection of EGFR T790M in gefitinib or erlotinib resistant non-small cell lung cancer. *Clin. Cancer Res. 15 2630-6*
10. Mitani N *et al* (2007) Surveyor nuclease-based detection of p53 gene mutations in haematological malignancy. *Ann. Clin. Biochem. 44 557-9*
11. Engelman JA *et al* (2006) Allelic dilution obscures detection of a biologically significant resistance mutation in EGFR-amplified lung cancer. *J. Clin. Invest. 116 2695-2706*

Siehe auch http://world.transgenomic.com/files/literature/482146.pdf für Literaturhinweise zur SURVEYOR Nuclease und ihrer Anwendungen.

Anhang B

Fehlersuche

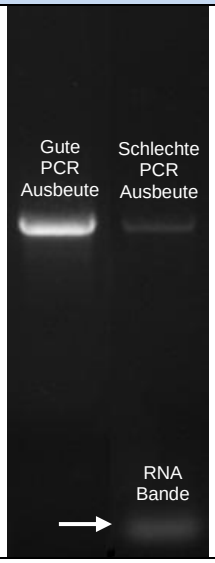
Die effektive Verwendung der SURVEYOR Scan-Kits für DHPLC hängt von der erfolgreichen Ausführung einer Reihe von Arbeitsschritten ab. Einer der entscheidendsten ist die PCR-Amplifikation, die zur Produktion einer ausreichenden Menge spezifischer, gleichmäßig langer DNA führen muss, um nach der Hybridisierung und dem Surveyor-Verdau die entstandenen DNA-Spaltprodukte nachweisen zu können. Das wiederum hängt von der Qualität der Ausgangsprobe ab. Die Durchführung dieses Tests mit DNA, die nicht den Qualität- und Quantitätskriterien entspricht, ist nicht empfehlenswert.

Anmerkung: Wenn Sie zum ersten Mal mit SURVEYOR Nuclease arbeiten, führen Sie die Untersuchungen im Abschnitt ***Verwendung von Kontrollplasmid-DNAs*** durch, nachdem Sie den Abschnitt ***Schritt-für-Schritt-Anleitung*** gelesen und verinnerlicht haben. Bevor Sie sich an den technischen Kundendienst von Transgenomic wenden, warten Sie bitte die Ergebnisse für die Kontrollplasmid-DNAs ab.

Diese Fehlersuche deckt eine Liste von Problemen ab, die bei der Arbeit mit den SURVEYOR Scan-Kits für DHPLC auftreten können, sowie Vorschläge, wie sie zu lösen sind.

Konsultieren Sie das Bedienungshandbuch des DHPLC-Systems für detaillierte Anleitungen in Bezug auf Gerätebetrieb und Wartung. Das Bedienungshandbuch enthält spezifische Verfahren zur Überprüfung und Wartung der Säulenleistung und beinhaltet Einzelheiten zur Fehlersuche.

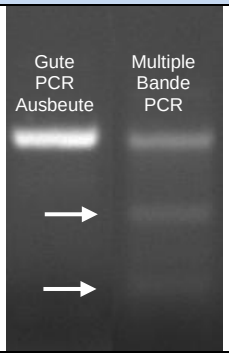
Problem 1 – Niedrige PCR-Ausbeute oder kein PCR-Produkt, wenn auf Agarosegel analysiert bzw. verifiziert wurde

NIEDRIGE PCR-AUSBEUTE	MÖGLICHE URSACHE	LÖSUNG
	Schlechte Qualität der DNA-Matrize	Wiederholen Sie die Aufreinigung der DNA. Überprüfen Sie die verwendete Aufreinigungsmethode. Wenn die FFPE-extrahierte DNA zu fragmentiert ist, können alternative FFPE-Blocks erforderlich sein.
	Zu viel RNA in der Probe verursacht die Überbewertung der DNA-Konzentration	Wiederholen Sie die RNase Behandlung der DNA-Probe und reinigen Sie die DNA erneut.
	Thermocycler nicht kalibriert	Führen Sie die Kalibrierung des Thermocyclers durch.
	Nicht ausreichende Matrize	Erhöhen Sie die Matrizenmenge.

Anmerkung: Es sollte hochwertige DNA aus FFPE verwendet werden. Die DNA sollte eine durch Absorption bei 260 nm gemessene Konzentration von 25 ng/µL aufweisen, sowie ein Absorptionsverhältnis von 260:280 nm von größer 1,8 haben und größer als 90% DNA sein (d. h. nahezu frei von tRNA- und rRNA-Kontamination laut Agarosegelauswertung). DNA-Proben zwischen -20 °C und -80 °C aufbewahren.

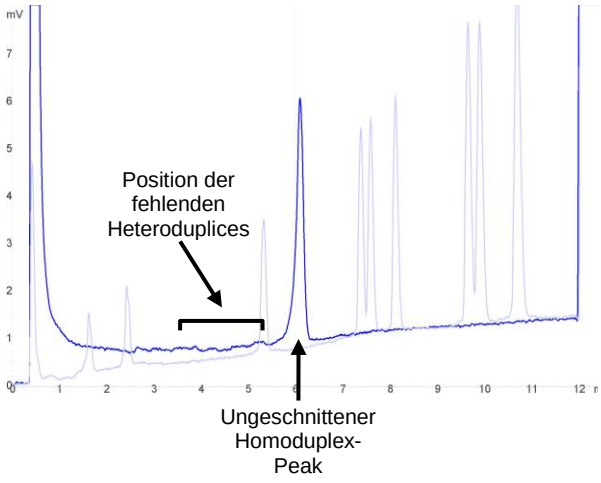
Die Analyse von DNA-Template, das aus paraffineingebettetem Gewebe extrahiert wurde, erfordert mehrere Vorsichtsmaßnahmen. Die DNA kann mit Uracil-DNA-Glycosylase behandelt werden, um eine Amplifikation von DNA-Fragmenten zu vermeiden, die deaminierte C-Reste enthalten. Häufig wird ein hoher Prozentsatz des aus dem paraffineingebetteten Gewebe extrahierten A_{260} Adsorptionsmittels bei der PCR nicht gut amplifiziert. Oft hilft eine größere Menge Start-DNA, um ein geeignetes Amplifikationsprodukt zu erhalten. Eine weitere Überlegung wäre, FFPE-Tumorschnitte mit einem hohen Prozentanteil an Tumorzellen zu wählen. Mikrodissektion kann ebenfalls verwendet werden, ist aber zeitaufwendig und für das normale Routinelabor nicht empfehlenswert.

Problem 2 – Mehrere PCR-Produkte, wenn auf Agarosegel analysiert bzw. verifiziert wurde

MEHRERE PCR-PRODUKTE	MÖGLICHE URSACHE	LÖSUNG
	Anlagerungstemperatur zu niedrig	Überprüfen Sie die Kalibrierung des Thermocyclers.

Anmerkung: PCR sollte einen ausreichend hohen Ertrag (größer als 20 ng/µL) eines **EINZELNEN** amplifizierten Amplikons der richtigen Länge erzeugen. **Für die PCR muss die in diesem Kit mitgelieferte DNA Polymerase und der DNA Polymerase 10X PCR Buffer verwendet werden.** Amplikons aus Kontrollen müssen mit der SURVEYOR Nuclease verdaut und analysiert werden, um durch Sichtprüfung der Chromatogrammprofile störendes Hintergrundrauschen auszuschließen (siehe ***Beispielergebnisse, Abbildung 4***). Kontrollieren Sie vor dem Verdau jedes amplifizierte DNA-Produkt durch Gelelektrophorese (oder durch Analyse mit dem DHPLC-System), um sicherzugehen, dass es ein einzelnes Amplikon der erwarteten Länge ist.

Problem 3 – Keine DNA-Spaltprodukte bei der Analyse nach SURVEYOR Nuclease-Behandlung der Heteroduplices

KEINE DNA-SPALTPRODUKTE	MÖGLICHE URSACHE	LÖSUNG
	Anteil an Mismatch-Ziel zu gering	Test anhand der Kontrollen überprüfen.
	Ineffiziente Bildung von Heteroduplices	Führen Sie das PCR- und Hybridisierungsverfahren genau nach Anleitung durch. Verwenden Sie für den SURVEYOR Nuclease-Verdau frisch hybridisierte DNA. Wiederholen Sie die PCR-Amplifikation mit (1) derselben Menge DNA-Template, (2) erhöhen Sie die Menge der Template-DNA, oder (3) isolieren Sie frische DNA von demselben oder einem anderen FFPE-Schnitt.
	Inaktive SURVEYOR Nuclease	Führen Sie eine Reaktion mit Kontrollen durch, um die Enzymleistung zu verifizieren. Nur frisch hergestellten SURVEYOR Nuclease Master-Mix verwenden.

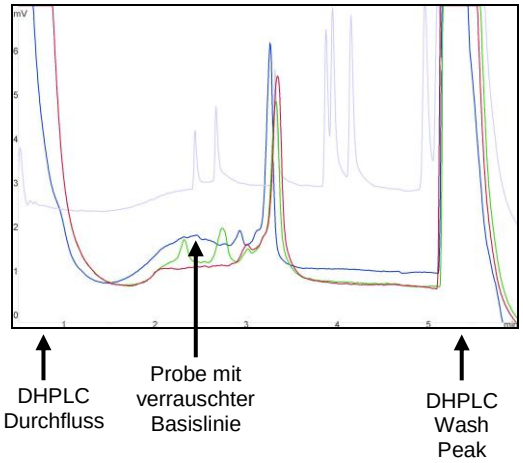
Anmerkung: SURVEYOR Nuclease spaltet überwiegend bei Mismatches in Heteroduplices. Das Verhältnis von Heteroduplex zu Homoduplex in der hybridisierten Probe bestimmt das Verdausignal in der SURVEYOR Nuclease. Wenn die *KRAS*-Mutation in der genomischen DNA-Probe in sehr geringer Konzentration vorliegt, kann das Signal für ein positives Ergebnis zu niedrig sein.

Es ist wichtig, darauf zu achten, dass der Hybridisierungsschritt im Thermocycler-Programm enthalten ist (siehe ***Amplifikationsprotokoll***), um die Leistung der Heteroduplexbildung zu optimieren. Heteroduplices werden bei Standard-PCR-Reaktionen mit sehr geringem Ertrag gebildet.

Anmerkung: Der Signal-Rausch-Abstand ist im Allgemeinen hoch genug, um Mutationen mit einem geringeren Prozentsatz der Gesamt-DNA-Matrize nachzuweisen. Es ist möglich, bis 2% mutante DNA zu detektieren. ***Abbildung 4*** zeigt die mit Homoduplex und Heteroduplex *KRAS* Positive Control-DNAs (in diesem Kit enthalten) und FFPE-Proben generierten Verdauprodukte auf einem WAVE DHPLC 4500 System. Die Spaltprodukte sind deutlich als zwei neue Peaks zu erkennen, die mit der erwarteten Länge bzw. Größe eluiert wurden. Die Länge bzw. Größe kann anhand des DNA-Längenstandards berechnet werden.

Achtung: Im Handel erhältliche PCR-Puffer unterscheiden sich stark in der Zusammensetzung und häufig ist die Zubereitung vom Hersteller nicht genau gekennzeichnet. Mehrere Puffer sind aufgrund von pH-Wert oder Zusatzstoffen, Tensiden oder anderen herstellereigenen Inhaltsstoffen mit der SURVEYOR Nuclease **NICHT** kompatibel. **Verwenden Sie KEINE anderen als die im Kit enthaltenen Polymerase oder 10X Polymerase-Puffer.**

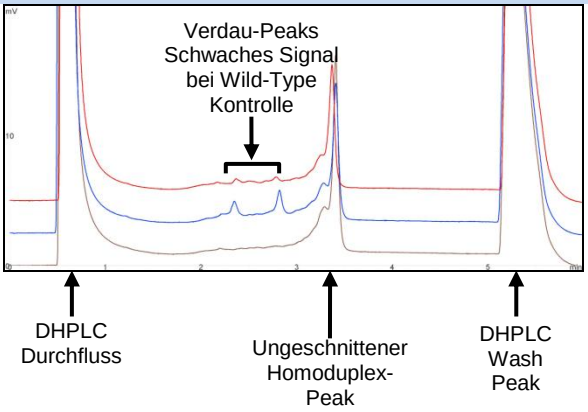
Problem 4 – Hohes Hintergrundrauschen nach SURVEYOR Nuclease-Behandlung

HOHES HINTERGRUNDRAUSCHEN	MÖGLICHE URSACHE	LÖSUNG
	Nicht optimaler Hybridisierungsschritt	Führen Sie folgende Schritte durch: 1. Vergewissern Sie sich, dass sich die DNA-Konzentration im Bereich >25 ng/µL befindet. 2. Wiederholen Sie den Schritt Heteroduplex-Bildung, achten Sie dabei darauf, das empfohlene Verfahren einzuhalten; siehe 12.7.1.
	DNA-Menge zu niedrig	Überprüfen Sie die Ergiebigkeit und Qualität der DNA-Matrize bzw. der Template-DNA
	Nicht-spezifische PCR-Produkte	Überprüfen Sie die Ergiebigkeit und Qualität der DNA-Matrize bzw. der Template-DNA.
	SURVEYOR Enhancer W2 und/oder SURVEYOR Enhancer Cofactor wurden deaktiviert.	Überprüfen Sie das Ablaufdatum des Kits.

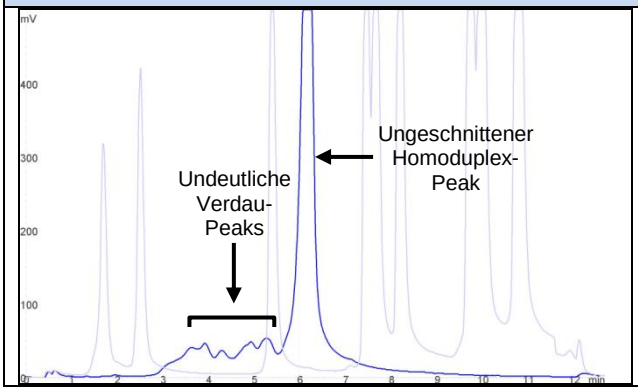
Anmerkung: Die SURVEYOR Nuclease schneidet gelegentlich bei doppelsträngigen DNAs an zufällig ausgewählten Gen-Orten. Dies erzeugt nach dem Verdau ein Hintergrundrauschen. Diese Aktivität wird durch den SURVEYOR Enhancer W2 und seinen Cofactor unterdrückt, ohne ansonsten die Mismatch-Spaltreaktionen negativ zu beeinträchtigen. SURVEYOR Enhancer W2 und SURVEYOR Enhancer Cofactor sind in diesem Kit enthalten und sollten immer verwendet werden.

Wenn dieses Anschneiden weiter auftritt, werden kleine unspezifische Peaks auf dem DHPLC-System erzeugt. Durch Vergleich der Kontrollverdaus von Homoduplices mit dem Probenverdau können diese unspezifischen Peaks erkannt werden.

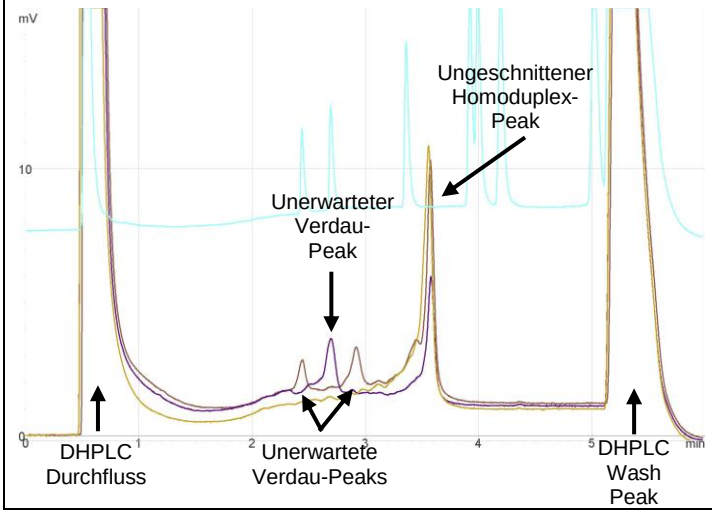
Problem 5 – Peaks des SURVEYOR Nuclease-Verdaus bei Negativkontrollen

VERDAU-PEAKS BEI NEGATIVKONTROLLEN	MÖGLICHE URSACHE	LÖSUNG
	Kontamination von Kit-Bestandteilen mit *KRAS*-Amplikons oder Plasmid-Kontrollen.	**Alle Kit-Komponenten entsorgen und ein neues Kit verwenden**. Kontaktieren Sie den Technischen Kundendienst von Transgenomic, um potenzielle Ursachen und Quellen der Kontamination zu besprechen.

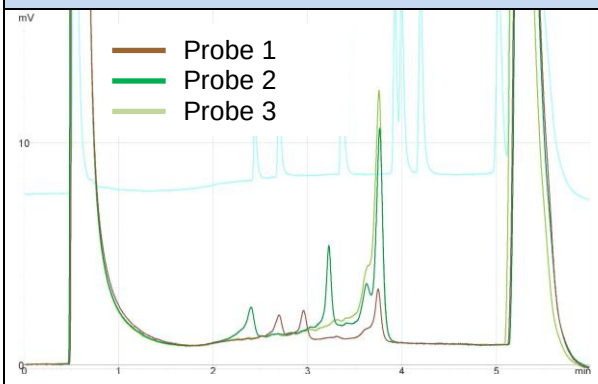
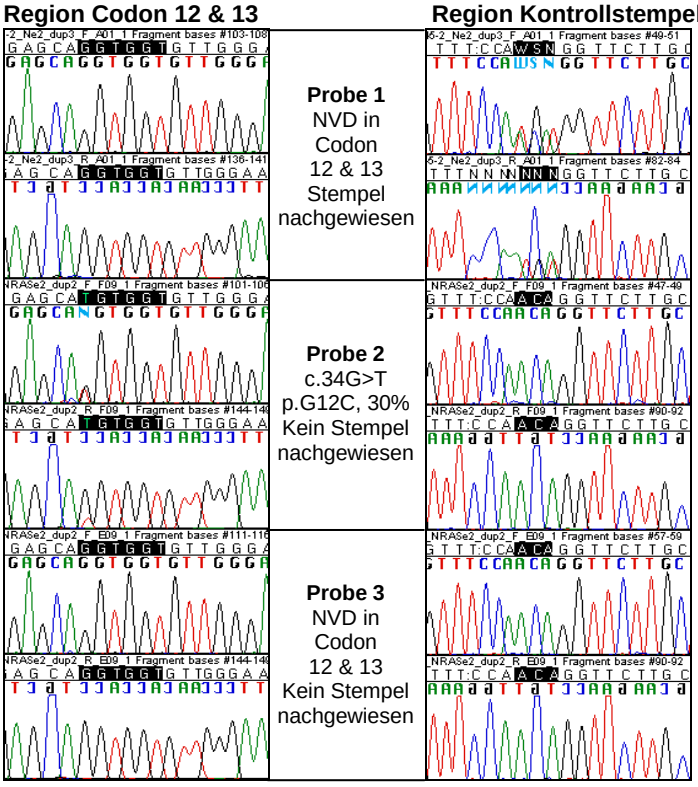
Problem 6 – Fehlgeschlagene SURVEYOR Nuclease-Ergebnisse bzw. SURVEYOR Nuclease-Verdau

DER SURVEYOR NUCLEASE-VERDAU DER POSITIVKONTROLLEN IST FEHLGESCHLAGEN	MÖGLICHE URSACHE	LÖSUNG
	SURVEYOR Nuclease nicht hinzugefügt	Eine neue Probe verdauen.
	SURVEYOR Nuclease-Verdau wurde bei falscher Temperatur durchgeführt.	Eine neue Probe verdauen.

Problem 7 – Unerwartete Peaks beim SURVEYOR Nuclease-Verdau

DER SURVEYOR NUCLEASE-VERDAU DER POSITIVKONTROLLEN IST FEHLGESCHLAGEN	MÖGLICHE URSACHE	LÖSUNG
	Mutation befindet sich an ungewöhnlicher Stelle.	Probe sequenzieren, um Mutation zu bestätigen.

Problem 8 – Kontamination von Probe mit Positive Controls

Verdaumuster stimmen mit Anwesenheit von gestempelten Regionen der gemischten Positive Controls und Wild-Type-Heteroduplices überein.	MÖGLICHE URSACHE	LÖSUNG
 **Region Codon 12 & 13** **Region Kontrollstempel**  **Probe 1** NVD in Codon 12 & 13 Stempel nachgewiesen **Probe 2** c.34G>T p.G12C, 30% Kein Stempel nachgewiesen **Probe 3** NVD in Codon 12 & 13 Kein Stempel nachgewiesen	Schlechte Pipettiertechnik	Beim Pipettieren der Proben besonders darauf achten, dass es nicht zu Kreuzkontaminationen kommt. Überprüfen Sie die Regionen der Kontrollstempelsequenz auf Kontamination der Positive Control.

Einzelheiten zur Bestellung

Produkt-nummer	Produktname	Größe
710104	SURVEYOR Scan *KRAS* Kit Exon 2 CE IVD	100 Reaktionen
710106	SURVEYOR Scan *KRAS* Kit Exons 3 & 4 CE IVD	100 Reaktionen
710400	SURVEYOR Scan *NRAS* Kit Exons 2, 3 & 4 CE IVD	100 Reaktionen
710077	CRC *RAS*can Combination Kit for *KRAS* and *NRAS* Exons 2, 3 & 4 CE IVD	230 Reaktionen

Kontaktdaten

Hauptniederlassung
Transgenomic, Inc.
12325 Emmet Street
Omaha
Nebraska 68164
United States of America

Tel.: (888) 233-9283* oder +1 (402) 452-5400
Fax: +1 (402) 452-5401
E-Mail: support@transgenomic.com

Europa
Transgenomic Limited
40 Watt Road
Hillington Park, Hillington
Glasgow G52 4RY
United Kingdom

Tel.: +44 141 892 8800
Fax: +44 141 883 5967
E-Mail: support@transgenomic.com

*Nur in Nordamerika

www.Transgenomic.com

Transgenomic®
Advancing Personalized Medicine

Übersetzung Verzicht

Transgenomic, Inc. hat alle Anstrengungen unternommen, um die Genauigkeit dieser Übersetzung sorgen gemacht. Wenn Sie Fragen zu Angaben in dieser übersetzte Version des Handbuchs haben, auf die englische Version ***Instructions for Use for the SURVEYOR® Scan KRAS Kit Exon 2 CE IVD for DHPLC Systems*** – 482404(EN) http://world.Transgenomic.com/files/literature/482404-EN.pdf und / oder Kontakt zu verweisen Transgenomic support@transgenomic.com.

Lizenzen, Handelsmarken & Copyright

SURVEYOR Nuclease: Dieses Produkt wurde unter exklusiver Lizenz der US-Patente 6,699,980; 6,391,557; 5,869,245, sowie zugehöriger Patentansprüche außerhalb der USA und weiterer anhängiger Patente hergestellt. Für die Verwendung von SURVEYOR Nuclease ist eine Lizenz von Transgenomic erforderlich. Akademische, Non-Profit und For-Profit-Organisationen besitzen mit Kauf dieses Produkts eingeschränkte Rechte, die SURVEYOR Nuclease zu Forschungszwecken zu nutzen. Ein Weiterverkauf bzw. eine anderweitige Verwendung sind streng verboten. Für weitere Informationen wenden Sie sich bitte an Transgenomic.

DNA Polymerase: Die Verwendung dieses Produkts ist durch eine oder mehrere der folgenden US-Patente: 5,789,224; 5,618,711; 6,127,155 sowie zugehöriger Patentansprüche außerhalb der USA geschützt: US-Patent Nr. 4,889,818 geschützt. Der Kauf dieses Produkts schließt ein eingeschränktes, nicht übertragbares Nutzungsrecht dieses Produkts für eigene Forschungszwecke des Käufers ein. Es wird damit kein Recht unter einem anderen Patentanspruch (wie die patentierten 5'Nuclease-Verfahrensansprüche unter US-Patent-Nummern 5,210,015 und 5,487,972), kein Recht zur Durchführung einer patentierten Methode sowie kein Recht zur Durchführung jedweder kommerzieller Dienstleistungen, insbesondere die Übermittlung von Ergebnisse der Tätigkeiten von Erwerbern gegen ein Honorar oder andere wirtschaftliche Gegenwerte, weder ausdrücklich noch implizit bzw. durch Rechtsverwirkung abgetreten. Dieses Produkt dient ausschließlich Forschungszwecken. Für die diagnostische Verwendung unter Roche-Patenten ist eine separate Lizenz von Roche erforderlich. Für weitere Informationen über den Erwerb von Lizenzen wenden Sie sich an den Director of Licensing, Applied Biosystems, 850 Lincoln Centre Drive, Foster City, California 94404, USA.

Transgenomic, SURVEYOR und WAVE sind eingetragene Marken, und Navigator, CRC RAScan, das Helix-Logo und Advancing Personalized Medicine sind Marken von Transgenomic, Inc. Alle anderen Marken sind das Eigentum ihrer jeweiligen Inhaber.

© 2013 Transgenomic, Inc. Alle Rechte vorbehalten. Gedruckt in den USA.

Dokument Nr. 482404(DE) rev-04